

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas



TESIS

**Diseño de cebadores específicos de Amplificación Isotérmica Mediada por
Horquillas (LAMP) *in-house* para la detección diferencial del virus
dengue**

Presentada por:

Br. SCARLETT BARRIENTOS PEÑA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

Línea de Investigación:

BIOTECNOLOGÍA

Piura, Perú

2019

“Diseño de cebadores específicos de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP) *in-house* para la detección diferencial del virus dengue”

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

BIOTECNOLOGÍA



Br. Scarlett Barrientos Peña
EJECUTOR DE TESIS



Mtblgo. Jaime Fernández Ponce M.Sc

ASESOR INTERNO



Blgo. Oscar Patricio Nolasco Cárdenas M.Sc.

ASESOR EXTERNO

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo: **Scarlett BARRIENTOS PEÑA**, identificado con DNI N° **70086509**, Bachiller de Escuela Profesional de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**, de la Facultad de **CIENCIAS** y domiciliado en **Av Progreso Mz P lote 11** del Distrito **PAITA**, Provincia **PAITA**, Departamento **PIURA**. Celular: **938745540**. Email: **scarlett.barrientosp@gmail.com**.

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada, y/o realizada en el Perú o en el Extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código Penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, 07 de febrero del 2019



Scarlett Barrientos Peña
DNI N° 70086509

Art. 411.- El que, en un proceso administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4 Inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales – RENATI Resolución de Consejo Directivo N°033-2016-SUNEDU/CD.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

“Diseño de cebadores específicos de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP) *in-house* para la detección diferencial del virus dengue”

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

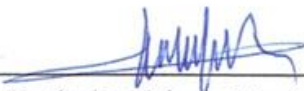
BIOTECNOLOGÍA



Moblgo. Cesar Torres Díaz. M.Sc.
PRESIDENTE DEL JURADO



Moblgo. María Dorothy Torres de León, M.Sc.
SECRETARIO DEL JURADO



Dr. Carlos Holguín Mauricci
VOCAL DEL JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN 010-2019-UI-FC-UNP

FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada "DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR HORQUILLAS (LAMP) in-house PARA LA DETECCIÓN DIFERENCIAL DEL VIRUS DENGUE", presentada por la señorita Bachiller SCARLETT BARRIENTOS PEÑA, con el asesoramiento del McBlgo. Jaime Napoleón Fernández Ponce, MSc y Co Asesor Blgo. Oscar Patricio Nolasco Cárdenas, MSc.; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, la declaran:

APROBADA (x)

DESAPROBADA ()

Con la mención de:

sobresaliente

() En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

() En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que la sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 07 febrero del 2019.

McBlgo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, MSc.
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

McBlgo. MARÍA DOROTHY TORRES GALLO, MSc.
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

Dr. CARLOS ENRIQUE HOLGUÍN MAURICCI
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla
PIURA - PERU

DEDICATORIA

A mis padres Ana y Jaime, por el ejemplo de perseverancia, valor
mostrado para salir adelante y amor brindado.

A mi hermana Lois, por cuidarme siempre como una segunda
madre y por haberme hecho conocer el amor incondicional a través
de mi sobrina Luciana.

Finalmente, a mi mamá Nena y mi querido profesor Wilder
Rodríguez, ambos en el cielo, cuya bondad y cariño quedarán
siempre en mi memoria.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de tesis no hubiese sido posible sin la oportunidad brindada por Dionicia Gamboa, coordinadora principal del Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Equipo de investigación del cual formo parte en la actualidad.

A CIENCIACTIVA, ente financiador del proyecto de tesis enmarcado en el Proyecto “Círculo de Investigación para la implementación de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial y TICs para la vigilancia de Zika, Dengue, Chikungunya y Malaria”. Convenio FONDECYT 162-2016.

A Oscar Nolasco Cárdenas, Co-Asesor y director principal del Círculo de Investigación, por darme la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura, por la mentoría brindada en el desarrollo de mi primer trabajo en biología molecular y por todas las enseñanzas aprendidas a lo largo del camino que supone el planteamiento de un proyecto de tesis.

A Jaime Fernández Ponce, Asesor del proyecto de tesis, por haberme incentivado desde mi pregrado el interés en temas de laboratorio y a buscar oportunidades en líneas relacionadas como es la biología molecular. Además, por su gran apoyo como crítico y consejero del presente trabajo, alentándome a continuar pese a las limitaciones que conlleva todo trabajo de investigación.

A mi gran amiga Ana Lucía Rosales Rosas, por su apoyo incondicional y por las aventuras que emprendimos con el objetivo de desarrollar nuestras tesis de licenciatura, no pude coincidir con una mejor persona en esta etapa. A Melissa Miranda Lucero por compartir momentos buenos y unos tanto difíciles con nosotras.

A mis padres Ana Peña Ato y Jaime Barrientos Benites por su amor infinito pese a mis episodios de estrés y por apoyarme en lograr mis objetivos académicos sin pensarlo en todo momento.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA	6
1.1. Descripción de la realidad problemática	6
1.2. Justificación e importancia de la investigación.....	7
1.3. Objetivos	8
1.4. Delimitación de la investigación	9
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	10
2.1. GENERALIDADES DE DENGUE:.....	10
2.1.1. Etiología.....	10
2.1.2. Ciclo de transmisión del virus dengue	10
2.1.3. Clasificación y cuadro clínico del dengue.....	12
2.1.4. Amplificación dependiente de anticuerpos	13
2.1.5. Diagnóstico.	14
2.1.6. Tratamiento.	18
2.1.7. Población en riesgo e incidencia.	19
2.1.8. Contexto actual de dengue en el Perú.	19
2.1.9. Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP).	22
2.1.10. Cebadores de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP)	23
2.1.11. Descripción de la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP).....	24
2.1.12. LAMP colorimétrico como alternativa diagnóstica del virus dengue.	25
2.2. HIPOTESIS.....	27
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	28
3.1. ENFOQUE Y DISEÑO.....	28
3.2. MUESTRA DE INVESTIGACIÓN	29

3.2.1.	Controles de estandarización y evaluación de sensibilidad y especificidad analítica	29
3.3.	MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS	30
3.3.1.	DISEÑO Y SELECCIÓN DE CEBADORES LAMP	30
3.3.2.	ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA DE LOS CEBADORES LAMP	33
3.3.3.	ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA	37
3.3.4.	EVALUACIÓN DE UN GRUPO DE MUESTRAS	38
3.3.5.	ASPECTOS ÉTICOS	39
	CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1.	RESULTADOS	40
4.1.1.	GENERACIÓN DE CEBADORES LAMP CANDIDATOS, ANALISIS <i>IN-SILICO</i> Y SELECCIÓN	40
4.1.2.	ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS CEBADORES LAMP DE DIFERENCIACIÓN	49
4.1.3.	ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA	50
4.1.4.	EVALUACIÓN DE UN GRUPO DE MUESTRAS	56
4.2.	DISCUSIÓN	57
	CONCLUSIONES	65
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los métodos empleados para el diagnóstico del virus dengue.....	18
Tabla 2. Propiedades del método de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP).....	22
Tabla 3. Ventajas y desventajas del método de Amplificación Isotérmica Medida por Horquillas... (LAMP).....	27
Tabla 4. Análisis <i>in-silico</i> de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-1	41
Tabla 5. Análisis <i>in-silico</i> de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-2.....	42
Tabla 5'. Análisis <i>in-silico</i> de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-2.....	43
Tabla 6. Análisis <i>in-silico</i> de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-3.....	44
Tabla 6'. Análisis <i>in-silico</i> de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-3.....	45
Tabla 7. Análisis <i>in-silico</i> de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-4.....	46
Tabla 7'. Análisis <i>in-silico</i> de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-4.....	47
Tabla 8. Cebadores LAMP de diferenciación para los cuatro serotipos del virus dengue	48
Tabla 9. Condiciones de amplificación isotérmica estandarizadas para los cebadores LAMP de diferenciación del virus dengue	49
Tabla 10. Panel de diluciones estándar para DENV-1.....	50
Tabla 11. Panel de diluciones estándar para DENV-2.....	50
Tabla 12. Panel de diluciones estándar para DENV-3.....	51
Tabla 13. Panel de diluciones estándar para DENV-4.....	51
Tabla 14. Especificidad analítica de los cebadores LAMP de diferenciación de dengue.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de replicación del virus dengue	11
Figura 2. Clasificación del dengue y sus síntomas clínicos según la OMS.....	12
Figura 3. Curso de la enfermedad del dengue	14
Figura 4. Comparación de las pruebas diagnósticas según su confianza y accesibilidad	15
Figura 5. Número de casos de dengue reportados anualmente a la OMS entre 1955 y 2010.....	20
Figura 6. Número de casos de dengue, Perú 2013- 2018.....	21
Figura 7. Cebadores LAMP.....	23
Figura 8. Estructura de inicio de fase cíclica de LAMP.....	24
Figura 9. Diseño de estudio.....	29
Figura 10. Curvas de regresión logística binomial para determinación del $LoD_{95\%}$ de los sets de cebadores LAMP	52
Figura 11. Distancias recomendadas entre los cuatro cebadores LAMP	73

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Características en el diseño de cebadores LAMP.....	73
Anexo 2. Generación de cebadores LAMP candidatos.....	75
Anexo 3. Análisis <i>in silico</i> de estructuras secundarias para los cebadores LAMP	77
Anexo 4. Análisis <i>in-silico</i> de especificidad para los cebadores LAMP	79
Anexo 5. Síntesis de ADNc: Transcripción reversa usando el protocolo <i>First-Strand Synthesis Using Random Primers</i>	82
Anexo 6. Amplificación de la secuencia de inserción para el proceso de clonación.....	84
Anexo 7. Precipitación de los productos de amplificación (inserto) empleando acetato de sodio y etanol.....	85
Anexo 8. Ligación por inserción en el vector pcr®2.1.....	86
Anexo 9. Transformación de bacterias <i>E.coli</i> químicamente competentes.....	87
Anexo 10. Purificación del ADN plasmídico	89
Anexo 11. Aprobación por el Comité de Ética de la UPCH.....	90
Anexo 12. Mapa de ubicación de los <i>targets</i> para los cebadores LAMP <i>in-house</i> dentro de la poliproteína del virus dengue	91
Anexo 13. Ensayo de determinación del LoD ₆ para cebadores LAMP de diferenciación del virus dengue	92
Anexo 14. Ensayo de especificidad analítica de los cebadores de diferenciación del virus dengue.....	93
Anexo 15. Evaluación de muestras por PCR en tiempo real y LAMP de diferenciación.....	94

RESUMEN

En el presente trabajo, se realizó el diseño *in-house* de cebadores LAMP para el diagnóstico diferencial de los serotipos del virus dengue. Con este fin, secuencias del virus dengue fueron descargadas de la base de datos de GenBank. Las secuencias descargadas fueron alineadas en el software MEGA v7. Posteriormente PrimerExplorer V5 fue utilizado para generar sets de cebadores LAMP candidatos a partir de las regiones más conservadas, por cada serotipo. Cada set de cebadores fue evaluado para la formación de estructuras secundarias y especificidad utilizando OligoAnalyzer v3.1 y Primer Blast, respectivamente. Los sets con funcionamiento experimental específico pasaron a un proceso de optimización de las condiciones de amplificación, empleando colorante rojo neutro como indicador del cambio de pH en un rango de valor de 8U (reacción negativa: amarilla) a 6U (reacción positiva: fucsia). El límite de detección de los sets de cebadores diseñados fue de 664.99 copias/ μ L para DENV-1, 3035.75 copias/ μ L para DENV-2, 196476.8 copias/ μ L para DENV-3, y 207.65 copias/ μ L para DENV-4. El tiempo de incubación promedio fue de 1 hora \pm 10 minutos. La especificidad analítica determinada fue de 100%. Adicionalmente, se evaluó el funcionamiento específico de los cebadores LAMP empleando ARN extraído de siete muestras positivas a DENV-2, más una enzima de transcripción reversa. Los cuatro sets de cebadores diseñados se muestran como una alternativa prometedora para su empleo en las pruebas LAMP.

Palabras claves: Dengue, serotipo, *in-house*, LAMP, isotérmico, rojo neutro.

ABSTRACT

In this work, we performed the in-house design of LAMP primers for the differential diagnosis of dengue virus serotypes. To this end, dengue virus sequences were downloaded from GenBank. Downloaded sequences were aligned in MEGA v7. Subsequently PrimerExplorer V5 was used to generate sets of candidate LAMP primers from the most conserved regions, for each serotype. Each set of primers was evaluated for the formation of secondary structures and specificity using OligoAnalyzer v3.1 and Primer Blast, respectively. The sets with specific experimental performance went through a process of optimization of the amplification conditions, using neutral red dye as indicator for the pH change in a range of 8U (negative reaction: yellow) to 6U (positive reaction: purple). The limit of detection for the sets designed was 664.99 copies / μ L for DENV-1, 3035.75 copies / μ L for DENV-2, 196476.8 copies / μ L for DENV-3, and 207.65 copies / μ L for DENV-4. The average incubation time was 1 hour \pm 10 minutes. The analytical specificity determined was 100%. Additionally, the specific functioning of the LAMP primers was evaluated using RNA extracted from seven DENV-2 positive samples, plus an enzyme for reverse transcription. The four sets of designed primers are shown as a promising alternative for use in LAMP tests.

Keywords: Dengue, serotype, in-house, LAMP, isothermal, neutral red.

INTRODUCCIÒN

El número real de casos de dengue en la actualidad está insuficientemente notificado. Según se estima, se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año en países de regiones tropicales y subtropicales, de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente, convirtiéndose en la enfermedad viral más importante de los seres humanos transmitida por artrópodos («OMS | Dengue», 2018). De las especies del género *Aedes* que transmiten la enfermedad, la hembra del mosquito *Aedes Aegypti* es el vector primario del virus dengue, el cual se encuentra en hábitats urbanos («OMS | Dengue», 2018). En el Perú, según refiere el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades, se han reportado aproximadamente 74 300 casos en promedio entre los años 2017 y 2018, concentrándose éstos en los departamentos de Loreto, Madre de Dios, Piura, La Libertad y Tumbes («Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades», 2017; 2018)

Desde el reingreso del dengue al Perú en el año 2000, se han desarrollado e implementado diferentes estrategias para su control, sin embargo, factores como la migración interna del vector de áreas endémicas hacia áreas libres, así como los cambios climáticos, hacen que su real control sea un reto y que exista el riesgo de su expansión a nuevas áreas (Cabezas S, 2005). Pese a ello, para una enfermedad tan compleja en sus manifestaciones, el manejo es relativamente sencillo y muy efectivo, siempre y cuando se instauren intervenciones correctas y oportunas. La clave es el reconocimiento temprano de los casos de dengue, lo cual no solo reduce el número de hospitalizaciones innecesarias, sino que salva la vida de los pacientes (Organization, 2009).

El actual diagnóstico de dengue se basa en pruebas directas como el aislamiento viral y su identificación, la detección viral por métodos moleculares o mediante la detección de antígeno viral (Velarde, 2005). El aislamiento viral es considerado el *Gold Standar*, sin embargo, requiere más de siete días para su análisis (Teoh, Sam, Tan, Johari, Danlami, Hooi, Md-Esa & AbuBakar, 2013), mientras tanto, las pruebas moleculares como Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la

Polimerasa (RT-PCR) o RT-PCR en Tiempo Real (RT-qPCR) son altamente sensibles y específicas (Lau, Lai, Teoh, Abd-Jamil, Johari, Sam, Tan & AbuBakar, 2015; Teoh et al., 2013) pero requieren de equipo sofisticado y personal altamente capacitado, limitándolas a Laboratorios de Referencia Nacional (Pongsiri, Praianantathavorn, Theamboonlers, Payungporn, & Poovorawan, 2012).

La serología forma parte del diagnóstico indirecto del dengue y es complicada debido a la reactividad cruzada entre los serotipos y otros flavivirus (Cabezas S, 2005; Velarde, 2005). Aun así, los ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA), se han convertido en métodos de elección para el diagnóstico serológico de dengue, por ser rápidos, fáciles de elaborar y económicos (Velarde, 2005).

Una técnica molecular descrita por Notomi y colaboradores en el año 2000, denominada Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP), ha sido ampliamente estudiada en el diagnóstico de diversas enfermedades y provee un sistema alternativo fácil y simple que procede a la amplificación de la muestra en condiciones isotérmicas (Notomi, Okayama, Masubuchi, Yonekawa, Watanabe, Amino & Hase, 2000), además puede amplificar pocas copias de ADN sin influencia significativa por la co-presencia de otro ADN que no sea el blanco (Lau et al., 2015; Notomi et al., 2000).

El alto grado de síntesis de ADN de este método molecular, da como resultado la formación de pirofosfato de magnesio, el cual es difícil de visualizar directamente (Sánchez, Nina, Aguirre, Arce, Toro & Vilela, 2014). Actualmente para hacer más práctico el método se ha incorporado el uso de colorantes sensibles al pH; el empleo de estos colorantes se basa en la acidificación del medio como producto de la liberación de iones hidrogeno durante la síntesis de la cadena nascente de ADN, lo cual produce el viraje del indicador de pH (Tanner, Zhang, & Evans, 2015). LAMP ofrece una ventaja, al ser un método empleable en laboratorios de bajos recursos (Hamid, Widyasari, Purwati, & Krediasuti, 2015), representando una alternativa que permite el manejo temprano de los casos.

En este sentido, el presente trabajo de investigación diseñó y determinó el funcionamiento de cebadores de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP) para la detección diferencial del virus dengue. Los cebadores LAMP ofrecen una alta especificidad al método debido a que permiten el reconocimiento de seis regiones independientes en el blanco durante la reacción inicial y cuatro regiones independientes durante las siguientes etapas (Notomi et al.; 2000). Pese a estas ventajas, el diseño y funcionamiento de estos cebadores no ha sido investigado en el Perú para la detección del virus dengue. La generación de estos cebadores de diferenciación son el primer paso para una potencial alternativa de diagnóstico molecular en Laboratorios de Nivel Local, en los que hasta el momento las muestras sospechosas a dengue deben ser trasladadas hacia Laboratorios de Nivel Regional y de Referencia Nacional para ser diagnosticadas y confirmadas («Resolución Ministerial N° 087-2011 - MINSA», 2011), deviniendo en un periodo no oportuno de tiempo de espera y reduciendo la probabilidad de ser diagnosticadas correctamente.

CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA

1.1. Descripción de la realidad problemática

Las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de muerte a nivel mundial, en este contexto, el dengue es un problema creciente para la salud pública en las áreas tropicales del mundo (Cabezas S, 2005). Según el Instituto Nacional de Salud (INS), en el Perú se encuentran circulando los cuatro serotipos del virus dengue (Mostorino, Rosas, Gutierrez, Anaya, Cobos & García, 2002), llegándose a determinar que en 1990 se introdujo DENV-1 desde la ciudad de Iquitos, en 1995 el genotipo americano de DENV-2, DENV-3 fue reconocido a partir del 2001, mientras DENV-4 a partir del 2008 (Cabezas, Fiestas, García-Mendoza, Palomino, Mamani & Donaires, 2015).

En 2017, el Perú reportó un total de 76 093 casos de dengue, entre confirmados y probables; de éstos el 35.8 % (27 249) de los casos fueron confirmados y el 64.2 % (48 844) correspondieron a casos probables procedentes de 19 de los 24 departamentos del país («Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades», 2017). Estos datos sugieren una deficiencia en la confirmación de los casos, vinculada a las limitaciones diagnósticas del momento.

Las pruebas actualmente disponibles en nuestro país, desarrolladas en el Instituto Nacional de Salud (INS), están divididas en aquellas que se utilizan para muestras menores o iguales a 5 días de desarrollados los síntomas: el aislamiento viral, pruebas moleculares como RT-PCR convencional y en tiempo real, secuenciación genética y ELISA Antígeno NS1, las cuales se emplean generalmente en laboratorios de referencia debido a su complejidad o con fines investigativos como es el caso del aislamiento viral, debido a que su valor clínico disminuye al

demorar entre una a dos semanas para obtener un resultado; mientras que las pruebas adecuadas para muestras de 6 o más días de iniciados los síntomas son las serológicas *in house*: prueba ELISA de captura para detección de anticuerpos de tipo IgM, prueba ELISA IgG de captura para dengue y ELISA IgG indirecta, estas pueden ser empleadas luego de varios días de empezada la sintomatología, lo que reduce la posibilidad de mantener un adecuado manejo de casos (Gozzer, Vergara, & Hajar, 2016).

El diagnóstico eficiente y preciso del dengue es fundamental para la atención clínica, es decir, la confirmación de casos y el diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas (Organization, 2009). La búsqueda de nuevos métodos que permitan realizar un diagnóstico temprano y rápido, de protocolos fáciles y de bajo costo, así como la búsqueda de marcadores específicos, son entre otras, las tareas necesarias para una mejor vigilancia y control de la enfermedad (Velarde, 2005).

1.2. Justificación e importancia de la investigación

Desde el 2006, el dengue en el Perú es una amenaza para la salud pública, causando una gran pérdida económica en la sociedad. Actualmente un paciente con dengue gasta entre 450 a 3000 soles por día en hospitalización y costo de tratamiento según su gravedad. Debido al espectro de sintomatología del dengue similar a otras infecciones febriles, y a la circulación simultanea de los cuatro serotipos del virus, asociado a la gravedad de los casos, es importante desarrollar un sistema diagnóstico certero, siendo la detección de la infección un punto crítico de control.

La detección y confirmación de casos de dengue en el Perú es deficiente debido a la falta de tecnología y transferencia de pruebas a los Laboratorios del nivel local (puestos de salud y hospitales), por lo que la única alternativa es disponer del envío de las muestras a los Laboratorios Regionales, los que a su vez realizan únicamente el diagnóstico serológico, disponiendo nuevamente el traslado de las muestras hacia el Laboratorio de Referencia Nacional (INS) para

la respectiva confirmación virológica molecular, deviniendo en una disminución de la probabilidad de detección del virus dengue y por tanto un déficit en el manejo de los casos («Resolución Ministerial N° 087-2011 - MINSA», 2011).

Desde el año 2005 se ha reportado el uso del sistema de Transcripción Reversa -LAMP (RT-LAMP) con fines de investigación para su empleo como método diagnóstico rápido, sensible y específico del dengue (Parida, Horioka, Ishida, Dash, Saxena, Jana, Islam, Inoue, Hosaka & Morita, 2005). En los años posteriores a este, se ha seguido investigando diferentes blancos que mantengan o mejoren la eficiencia del RT-LAMP para la detección y diferenciación del virus dengue con resultados prometedores comparado con técnicas como ELISA y PCR en Tiempo Real (Hu, Li, Zhong, Lu, Liu, Pu, Wen & Huang, 2015; Lau et al., 2015).

El diseño y funcionamiento óptimo de cebadores LAMP específicos de diferenciación del virus dengue, en nuestro país, es el paso inicial para una potencial alternativa de detección del virus en etapas tempranas (etapa febril). Además, la técnica LAMP, por la ventaja que exhibe de ser un método adecuado para laboratorios de poco equipamiento, puede ser transferible a puestos de salud y hospitales del nivel local.

1.3. Objetivos

El objetivo del presente proyecto de investigación fue el diseño de cebadores específicos para un sistema LAMP *in-house* que permita la detección diferencial del virus dengue.

Como objetivos específicos se contempló el diseño y selección de cebadores para su empleo en el sistema LAMP, la evaluación *in silico* de los mismos, la clonación de los blancos (*targets*) para la estandarización de las condiciones de amplificación y la determinación de la sensibilidad (Limite de detección) y especificidad analítica de los cebadores de diferenciación del virus dengue.

1.4. Delimitación de la investigación

Este trabajo está incluido en el área de ciencias médicas y de salud, sub área de biotecnología en salud y dentro de la disciplina de tecnología para la detección e identificación de material genético aplicada al diagnóstico molecular del virus dengue.

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Malaria, de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía, y la Unidad de Epidemiología Molecular (UEM) del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Ambos ubicados en la Av. Honorio Delgado 430, Urbanización Ingeniería, Distrito de San Martín de Porres, Provincia de Lima, Departamento de Lima, Perú.

Todo el proceso fue ejecutado desde septiembre del 2017 hasta septiembre del 2018; periodo que incluyó el diseño de los cebadores LAMP específicos a cada serotipo del virus dengue, estandarización de los cebadores y la evaluación de la especificidad y sensibilidad analítica de los mismos.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DE DENGUE:

2.1.1. Etiología

Dengue es una enfermedad infecciosa producida por el virus del dengue (DENV) perteneciente a la familia Flaviviridae (Flavivirus), que a su vez forma parte del grupo de los Arbovirus (virus transmitidos por artrópodos). Es transmitido por la picadura de la hembra del mosquito *Aedes aegypti* (Arthropoda:Culicidae), convirtiéndola en la enfermedad viral más importante de los humanos transmitida por artrópodos. El virus es de ARN monocatenario en sentido positivo y existen cuatro serotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4; la infección por un serotipo produce inmunidad permanente contra la reinfección por ese serotipo, mientras la infección sucesiva con serotipos diferentes constituye un factor de riesgo para el desarrollo de las formas graves de la enfermedad («OPS OMS | Dengue», 2018).

2.1.2. Ciclo de transmisión del virus dengue

La dinámica de transmisión comienza cuando un mosquito pica a una persona infectada, este adquiere el virus, que empieza a replicarse para su posterior extensión hacia las glándulas salivales (8 a 12 días de incubación), después de este tiempo el mosquito puede extender la infección hacia otras personas, empezando los síntomas en éstas 4 a 7 días después de la inoculación subcutánea, con una duración de 3 a 10 días de periodo virémico («Centers for Disease Control and Prevention CDC», 2014; Kelley, 1993; Lázaro, 2008). El ciclo viral intracelular comienza con el acercamiento del DENV a la superficie celular y la posterior interacción de la proteína E con proteínas o proteoglicanos de la membrana celular que median la unión y posterior endocitosis del virus; la vesícula endocítica se transforma

entonces en un endosoma temprano y posteriormente en un endosoma tardío el cual se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula, induciendo al cambio conformacional de la proteína E que favorece la exposición y anclaje del péptido de fusión a la membrana de la vesícula, conllevando finalmente a la liberación de la nucleocápside al citoplasma (Figura 1) (Velandia & Castellanos, 2011).

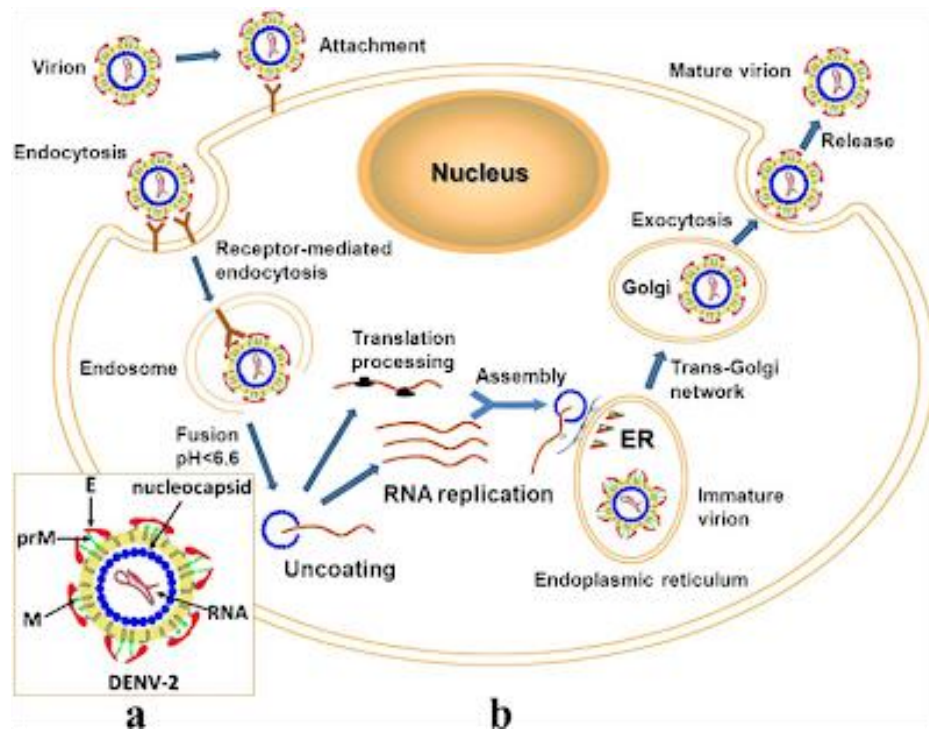


Figura 1. Ciclo de replicación del virus dengue. a) Estructura del virus dengue. b) Proceso de replicación y liberación del virus dengue. (Tomado de Celaya, 2016).

Una vez el ARN es liberado en el citoplasma, secuestra la maquinaria de la célula huésped para replicarse a sí mismo, iniciándose los procesos de traducción y replicación (Figura 1) («Asociación de Microbiología y Salud», 2016). El ARN genómico viral de DENV es procesado en el retículo endoplasmático por proteasas celulares liberando de forma ordenada a las tres proteínas estructurales (C, prM/M y E) y las siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, N5) encargadas de la replicación del genoma y el ensamblaje

viral; así, el ARN viral recién sintetizado se incluye en las proteínas C, formando la nucleocápside, sobre esta luego se asocian las proteínas prM/M y E de envoltura viral conformando las partículas virales inmaduras que viajan a través de las regiones *cis* y *trans* del aparato de Golgi donde maduran (Figura 1); finalmente cuando el virus es liberado, el pH neutro del espacio extra citoplasmático permite que la proteína E adquiera su conformación final para ser reconocida por moléculas receptoras, siendo esta la forma viral infectiva («Asociación de Microbiología y Salud», 2016; Velandia & Castellanos, 2011).

2.1.3. Clasificación y cuadro clínico del dengue.

La clasificación recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2009, es la llamada clasificación revisada, la cual surgió a partir de los resultados DENCO, que incluyó casi 2 000 casos confirmados de dengue de los ocho países y dos continentes y establece dos formas de la enfermedad: dengue y dengue grave («OPS OMS | Dengue», 2018).

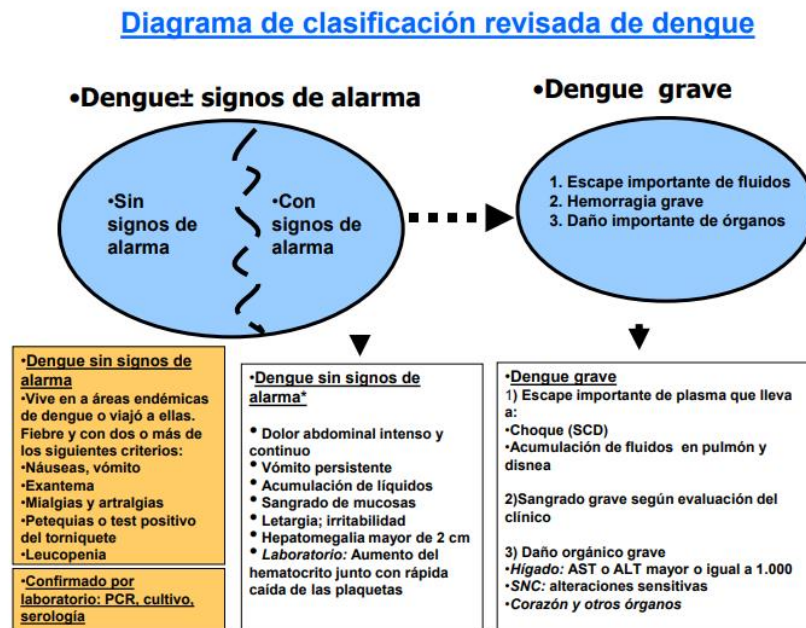


Figura 2. Clasificación del dengue y sus síntomas clínicos según la OMS. La clasificación según la gravedad tiene un gran potencial para su uso práctico por los médicos tratantes, para decidir dónde y cuan intensivamente se debe observar y tratar al paciente. (Tomado de «OPS OMS | Dengue», 2018).

En la Figura 2, se detalla la clasificación revisada de dengue según la OMS, además los síntomas clínicos que se presentan en cada una de ellas.

El denominado “dengue con signos de alarma” es parte de la forma dengue, pero, se le describe aparte por ser de extrema importancia su conocimiento para decidir conductas terapéuticas y prevenir una evolución hacia dengue grave («OPS OMS | Dengue», 2018).

2.1.4. Amplificación dependiente de anticuerpos

Existen factores de riesgo para desarrollar dengue grave (dengue hemorrágico o síndrome de shock de dengue), siendo el más importante, presentar una segunda infección por un serotipo diferente al que causó la infección primaria en el mismo individuo (Cabezas S, 2005).

Los anticuerpos actúan como un arma de importancia inmunológica en la prevención y control de muchas infecciones, aquellos que son específicos contra un virus pueden neutralizar a este evitando la infección viral de forma diferente, como por ejemplo la lisis celular uniéndose a las células infectadas y activando la cascada del complemento o uniéndose al receptor Fc de las células asesinas o monocitos/macrófagos. Sin embargo, los anticuerpos específicos pueden incrementar o “amplificar” también la replicación viral, un efecto conocido como Amplificación Dependiente de Anticuerpos (ADA) (Pupo, Amín, Álvarez, Morier, Rodríguez, González & Guzmán, 2004).

La reemergencia de los cuatro serotipos y la circulación de éstos simultáneamente, incrementan el riesgo de la infección secuencial; la hipótesis más aceptada está basada en el efecto ADA. Este efecto se presenta cuando los anticuerpos producidos contra un serotipo de DENV que causó la primera infección, reconoce y forma un complejo con un segundo serotipo del virus, los cuales ingresan a las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos) a través de la unión del fragmento constante de la inmunoglobulina con los receptores celulares Fc, favoreciendo la penetración del virus (Cabezas et al.; 2015;

Velandia & Castellanos, 2011). Este mecanismo incrementa la proporción de células infectadas, la viremia y la capacidad de dispersión del virus en el organismo. Además, el fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos estimula la activación en células como linfocitos y macrófagos, induciendo la liberación de citocinas y otros factores solubles que alteran, entre otros aspectos, la fisiología del tejido endotelial, lo que facilita la extravasación, la formación de edemas y hemorragias (Velandia & Castellanos, 2011)

2.1.5. Diagnóstico.

La infección por dengue es sistémica y dinámica. Después del periodo de incubación, la enfermedad comienza abruptamente y le siguen tres fases de evolución: la febril, la crítica y la de convalecencia. En la figura 3, se observa cada etapa del curso de la enfermedad y los cambios internos que estas conllevan.

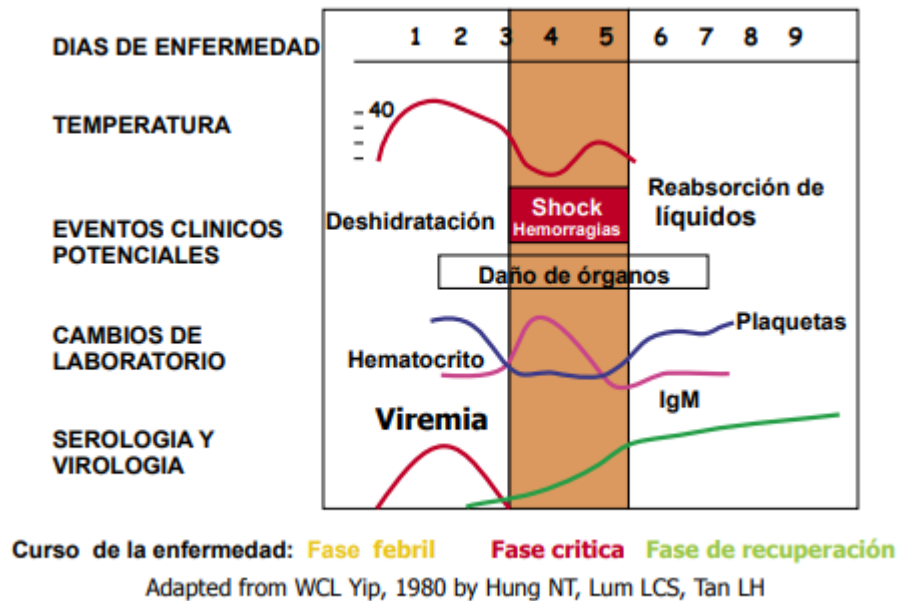


Figura 3. Curso de la enfermedad del dengue. En la fase febril la viremia se incrementa a su máximo nivel siendo apropiado aplicar métodos de diagnóstico directo, mientras tanto, en la fase crítica y de convalecencia (recuperación) son los títulos de los anticuerpos los que se incrementan mientras la viremia decrece por lo que es recomendable emplear métodos de diagnóstico indirecto. (Tomado de Pavlicich, 2016).

La selección del método de diagnóstico depende, entre otros, del propósito para el cual se realizan las pruebas, el tipo de laboratorio, los conocimientos técnicos disponibles, los costos y el tiempo de recolección de las muestras. En el caso de dengue, se divide en métodos de diagnóstico directo e indirecto (Figura 4).

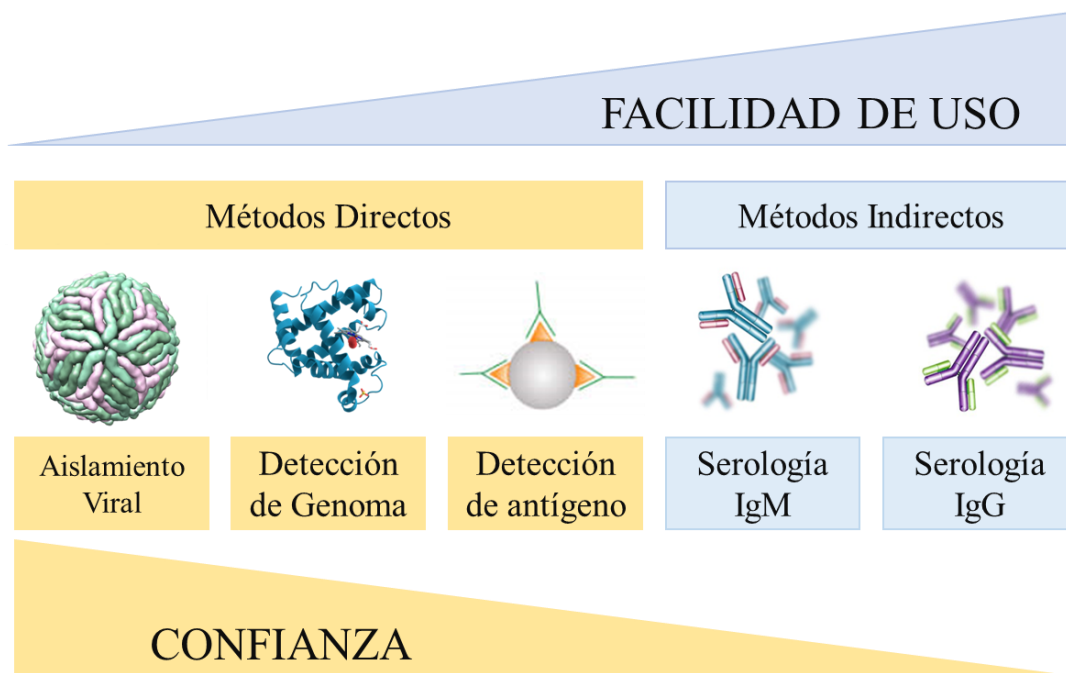


Figura 4. Comparación de las pruebas diagnósticas según su confianza y accesibilidad. Existe una relación inversa entre la facilidad o accesibilidad del método diagnóstico y la confianza en los resultados de la prueba. En amarillo, las técnicas de aislamiento viral y detección de ácidos nucleicos son más laboriosas y costosas, pero a la vez presentan una gran sensibilidad y especificidad en comparación a la detección de anticuerpos por métodos serológicos (en azul) los cuales sacrifican la sensibilidad y especificidad por la facilidad de realización. (Modificado de Organization, 2009).

2.1.5.1. Métodos directos:

2.1.5.1.1. Aislamiento Viral

Existen diferentes sistemas para la realización del aislamiento viral entre ellos se utilizan rutinariamente: la inoculación intracerebral de ratones recién nacidos, inoculación en cultivos celulares de mamíferos, inoculación intratorácica de mosquitos adultos, e inoculación en cultivos celulares de mosquito. Luego de la

inoculación se obtiene evidencia de replicación viral entre el día cinco o siete de haber inoculado la muestra en el medio de cultivo y posteriormente el reconocimiento de dengue se realiza empleando anticuerpos monoclonales o con pruebas de fijación de complemento. El cultivo en células de mosquito ha proporcionado un método relativamente rápido y sensible (Cabezas S, 2005), por lo que el aislamiento viral en líneas celulares de mosquitos C6/36 es considerado el *Gold Standar*. Sin embargo, este método diagnóstico es empleado en su mayoría con fines de investigación al ser una prueba costosa y con un requerimiento de más de siete días para su análisis (Teoh et al.; 2013).

2.1.5.1.2. Detección del antígeno NS1

La detección del antígeno NS1 en suero o plasma ha sido reportado como una herramienta prometedora para el diagnóstico de infecciones por dengue (Zhang et al., 2014). Sin embargo en algunos estudios realizados se ha podido obtener una excelente especificidad de hasta el 99%, mientras que la sensibilidad se ha reportado baja o muy variable (63%-79%) (Felix et al., 2012; Zhang et al., 2014), Por lo que actualmente se recomienda emplear estas pruebas en combinación con otro método diagnóstico (Gozzer et al.; 2016).

2.1.5.1.3. Diagnóstico Molecular

Las pruebas moleculares como el PCR ofrecen especificidad, sensibilidad y tiempo efectividad, además son capaces de diferenciar los serotipos de dengue. Estos sistemas son variables, empezando por el nested-PCR, multiplex PCR Y TaqMan real-time PCR con diferentes blancos de amplificación en el genoma viral (Hamid et al., 2015). El PCR en tiempo real para la detección del virus dengue alcanza una sensibilidad de hasta el 97.65% y especificidad de 92.59% (Pongsiri et al.; 2012) convirtiéndolo en una prueba altamente sensible y específica. Sin embargo, a pesar

de los beneficios que exhibe, necesita de equipo especializado, ADN extraído de alta calidad y altos conocimientos técnicos, lo que restringe la popularización de estos ensayos y lo convierte en un método de alto costo empleado típicamente en laboratorios de referencia (Ghosh, Nagavardhini, Sengupta, & Sharma, 2015; Hu et al.; 2015).

2.1.5.2.Métodos indirectos:

2.1.5.2.1. Diagnóstico serológico IgM e IgG

Las pruebas serológicas para los anticuerpos específicos al dengue, tipos IgG e IgM, se emplean para el diagnóstico primario y secundario. En las infecciones primarias y secundarias, IgM se presenta después de aproximadamente cinco días; mientras el IgG se produce entre dos a 4 semanas después de la infección primaria e inmediatamente después de la aparición de una infección secundaria (Pantoja, 2014). Sin embargo, tan pronto como surgió el método ELISA se evaluó para Flavivirus, encontrándose como desventaja de este método su baja sensibilidad, pues requiere de títulos muy altos de anticuerpos y además puede presentar reacción cruzada contra otros flavivirus (Acosta & Gómez, 2005).

En el Perú, la prueba ELISA de captura para la detección de anticuerpos IgM que es producida en el Instituto Nacional de Salud (INS) y ampliamente distribuida en la red de laboratorios a nivel nacional, según el formulario de validación, presenta una sensibilidad del 98.7% y una especificidad del 94.62%. Actualmente es el kit de diagnóstico más utilizado para la detección del virus dengue (Gozzer et al.; 2016).

Métodos de diagnóstico	Diagnóstico de infecciones agudas	Tiempo para resultados	Muestra	Tiempo de recolección después de la aparición de los síntomas
Aislamiento viral de identificación de serotipos	Confirmado	1-2 semanas	Sangre total, suero, tejidos.	1-5 días
Detección de ácidos nucleicos	Confirmado	1 o 2 días	Tejido, sangre total, suero, plasma	1-5 días
Detección de antígenos	Aún sin determinar confirmado	1 día >1 día	Suero Tejido para inmunohistoquímica	1-6 días NA
ELISA IgM IgM RDT`s	Probable	1-2 días 30 min.	Suero, plasma, sangre total	Después de 5 días
IgG (suero pareado) mediante ELISA, IH o neutralización	Confirmado	7 días o más	Suero, plasma, sangre total	Sueros agudos 1-5 días; convaleciente después de 15 días.

Tabla 1. Características de los métodos empleados para el diagnóstico del virus dengue. (Modificado de Organization, 2009).

2.1.6. Tratamiento.

Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), el tratamiento para dengue se divide en dos tipos: tratamiento ambulatorio y tratamiento hospitalario.

En el tratamiento ambulatorio se recomienda el control de la fiebre administrando acetaminofén (paracetamol) cada seis horas (cuatro dosis al día como máximo) y la realización de baños de esponja con agua tibia; además la prevención de la deshidratación administrando líquidos. El empleo de medicamentos que contengan aspirina e ibuprofeno

están totalmente prohibidos en el caso de dengue («Centers for Disease Control and Prevention CDC», 2014).

En el caso del tratamiento hospitalario para pacientes con señales de alerta de dengue, es importante la obtención del recuento sanguíneo de referencia. Si no hay una adecuada ingesta de líquidos, la administración de cristaloides isotónicos debe realizarse gradualmente (5 a 7 ml/kg/hora por 1 a 2 horas). Cuando los cambios del hematocrito sean mínimos, la administración de cristaloides isotónicos debe ser de 2 a 3 ml/kg/hora por 2 a 4 horas («Centers for Disease Control and Prevention CDC», 2014).

2.1.7. Población en riesgo e incidencia.

El dengue es una virosis emergente y reemergente originaria de las regiones tropicales y subtropicales cuya mayor incidencia se encuentra en Asia Sudoriental, el Pacífico occidental, el Mediterráneo oriental, África, Centro y Sudamérica (Evia, 2013). En las últimas décadas ha aumentado enormemente la incidencia de dengue en el mundo y con ello, alrededor del 40% de la población mundial corre el riesgo de contraer esta enfermedad, siendo el dengue grave, causa de enfermedad y muerte en niños principalmente en los países asiáticos y latinoamericanos («OPS OMS | Dengue», 2018).

2.1.8. Contexto actual de dengue en el Perú.

En las últimas décadas previas al siglo XXI, el dengue vuelve a tomar notoriedad en las Américas con el brote epidémico de dengue hemorrágico en 1981 en Cuba, seguido de un brote en Venezuela en los años 1990, constituyendo hitos que indicaron la diseminación progresiva de dicha enfermedad como fenómeno reemergente de la región, asociado a la reemergencia del dengue clásico en América del Sur (Maguiña Vargas, Osorio Plengue, Suárez Ognio, Soto Arquiniño, & Pardo Ruiz, 2005). En las últimas cinco décadas, la

incidencia de dengue se ha incrementado treinta veces (Figura 5) documentándose casos en áreas previamente no afectadas (Cabezas et al.; 2015).

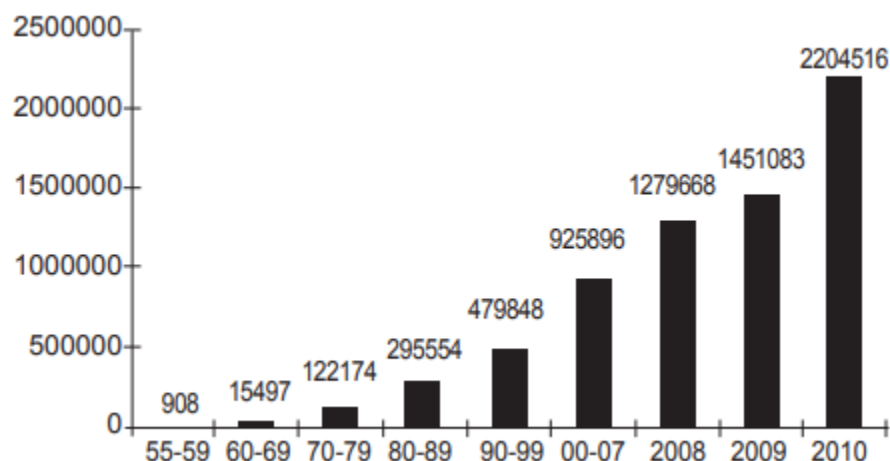


Figura 5. Número de casos de dengue reportados anualmente a la OMS entre 1955 y 2010. (Tomado de Cabezas et al.; 2015).

En Lima, los primeros reportes epidémicos de una enfermedad similar al dengue clásico, datan de 1700, 1818, 1850 y 1876, cuando todavía no era posible hacer una confirmación de la enfermedad por laboratorio (Maguiña Vargas et al.; 2005).

La introducción del dengue en el Perú en el siglo XX está ligado a la reintroducción del *Aedes aegypti*. Este vector luego de su eliminación en el Perú en 1956 reingresó en 1984, siendo inminente el ingreso del dengue (Cabezas S, 2005). En 1990 ocurrió una explosiva epidemia de dengue clásico por DENV-1 en las principales ciudades de nuestra Amazonia y, en la actualidad, casi todas las áreas del país con presencia de *Aedes aegypti* presentan casos de dengue y la circulación de los cuatro serotipos (Cabezas et al.; 2015).

En el año 2017 se notificó un total de 68 290 casos de dengue en el país, tres veces más casos en relación al 2016 y el mayor número de casos reportado en los últimos cinco años (Figura 6). En el 2018, hasta la semana epidemiológica 31, se notificaron 6022 casos de dengue,

aproximadamente ocho veces menos casos que el reportado en el 2017 para esa misma semana (Figura 6), esto debido a medidas de control instauradas ante la epidemia surgida el año previo («Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades», 2017; 2018).

Pese a los esfuerzos y recursos del ministerio de salud para implementar acciones de prevención y control contra el dengue denominadas “Plan Nacional de Lucha contra el Dengue” y el “Plan de Contingencia frente a los efectos de las lluvias 2017-2018” («MINSA», 2018) en regiones como Piura, San Martín, Madre de Dios, Ucayali, Amazonas, Tumbes, Ica y Lima; el dengue sigue siendo una enfermedad estacional autorregulable que de manera impredecible puede emerger trayendo consigo un gran número de casos en los años posteriores.



Figura 6. Número de casos de dengue, Perú 2013-2018. El reporte del número de casos de dengue en el 2018 está contemplado hasta la semana epidemiológica (SE) 31. (Tomado de «Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades», 2018).

2.1.9. Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP).

En el año 2000, se desarrolló y describió un novedoso método que podía amplificar un bajo número de copias utilizando condiciones isotérmicas y con alta especificidad. Este método se denominó Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP, por sus siglas en inglés) y fue desarrollada por Notomi y colaboradores (Notomi et al.; 2000).

El método LAMP se lleva a cabo empleando una temperatura constante (entre 60°C y 65°C), utiliza una enzima *Bst* polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena y presenta una señal de reconocimiento altamente sensible lo que permite al sistema la discriminación visual de resultados. La principal ventaja de LAMP en comparación del PCR y otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos es que no requiere de termocicladores, ya que puede llevarse a cabo en dispositivos de incubación simples tales como el baño maria o el bloque de calor de laboratorio (Sánchez et al.; 2014).

Propiedades de método LAMP

Simplicidad	Amplificación isotérmica en un solo paso, detección visual de productos amplificados.
Rapidez	Resultados de las pruebas finales entre 20 a 75 minutos.
Especificidad	Uso de cuatro cebadores que reconocen seis regiones distintas del ADN blanco.
Rentabilidad	No requiere de ningún reactivo especial ni de equipamiento sofisticado
Productos amplificados	Cantidad grande (10^9 - 10^{10} veces entre los 20 a 75 minutos) con diversos tamaños de estructuras de repeticiones invertidas de forma alterna con la secuencia diana en la misma cadena.
Amplificación de ARN	Amplificación isotérmica de ARN en un solo paso con solo añadir la transcriptasa reversa.

Tabla 2. Propiedades del método de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP). (Modificado de Sánchez et al.; 2014).

2.1.10. Cebadores de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP)

Para llevar a cabo una reacción LAMP se necesita del diseño de cuatro tipos de cebadores, basados en las distintas regiones del gen diana mencionadas a continuación: las regiones F3c, F2c y F1c en el lado 3' y las regiones B1, B2 y B3 en el lado 5'.

Los cebadores internos se denominan FIP (*Forward Inner Primer*) y BIP (*Backward Inner Primer*). FIP, consiste en la región F2 (en el extremo 3') que es complementaria a la región F2c en el *target* y la misma secuencia que la región F1c en el extremo 5'. BIP consiste en la región B2 (en el extremo 3') que es complementaria a la región B2c del *target*, y la misma secuencia que la región B1c en el extremo 5'.

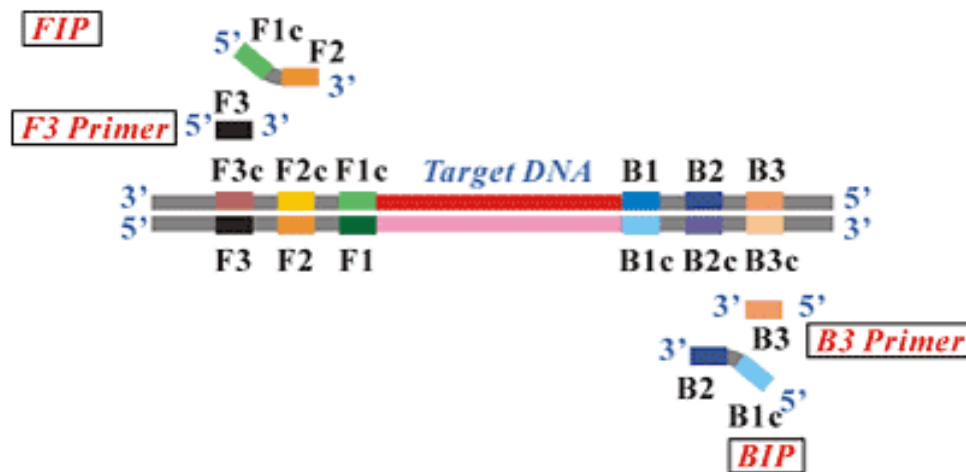


Figura 7. Cebadores LAMP. Son cuatro los cebadores diseñados para LAMP los cuales reconocen seis regiones específicas del *target*. (Tomado de «Eiken GENOME SITE», 2005).

Los cebadores externos se denominan F3 (*Forward Outer Primer*) y B3 (*Backward Outer Primer*). F3 se compone de la región F3 que es complementaria a la región F3c; mientras B3 consiste en la región B3 que es complementaria a la región B3c en el *target* («Eiken GENOME SITE», 2005).

2.1.11. Descripción de la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP)

La síntesis de ADN inicia utilizando la *Bst* polimerasa, la cual desplaza y libera una sola cadena de ADN. Con el método LAMP, a diferencia del PCR, no hay necesidad de denaturación por calor de la doble cadena de ADN. La amplificación se lleva a cabo en dos pasos: No Cíclico y Cíclico.

En la etapa no cíclica, los cebadores inician su acción en dirección 5'-3'. Primero interactúa el cebador FIP con el *target*, el cual se une a su región complementaria F2c y así comienza a sintetizar la hebra complementaria de ADN *target*. El siguiente cebador en interactuar es el F3 uniéndose a la región F3c del ADN *target*, la *Bst* polimerasa tiene una cualidad, esta actúa también como helicasa, lo que ocasiona que la doble cadena se abra y F3 pueda seguir con su camino. De la misma forma por el otro extremo, tanto BIP como B3 siguen los mismos pasos.

La hebra complementaria de cadena simple desplazada hace que por complementariedad sus extremos formen una horquilla, esta hebra es la que servirá como secuencia madre para la posterior síntesis de ADN (Figura 8).



Fig. 8. Estructura de inicio de fase cíclica de LAMP. Esta estructura forma bucles en ambos extremos debido a la complementariedad de bases, permitiendo el inicio de la fase de ciclado de LAMP. (Tomado de «Eiken GENOME SITE», 2005).

En la etapa cíclica, la amplificación se lleva a cabo solo empleando los cebadores internos FIP y BIP. En la secuencia madre interactúa nuevamente el cebador FIP donde la región F2 se une a su región F2c, realizando la hibridación, así como también por el otro extremo BIP

dónde la región B2 se une a su región B2c; en el transcurso de la polimerización las secuencias sintetizadas van adquiriendo una forma de coliflor («Eiken GENOME SITE», 2005).

2.1.12. LAMP colorimétrico como alternativa diagnóstica del virus dengue.

El alto grado de síntesis de ADN por el método LAMP da como resultado la formación de pirofosfato el cual reacciona con el ion magnesio; la consecuencia de la presencia de pirofosfato de magnesio en la reacción es un medio turbio que puede ser detectado por detección visual directa; sin embargo, incluso en condiciones ideales es difícil observar el precipitado (Sánchez et al.; 2014).

El empleo de intercalantes fluorescentes en el sistema LAMP, tales como bromuro de etidio, SYBR Green I, o Quant-iT PicoGreen, ha contribuido al mejoramiento de la detección visual de amplificación. Aunque estos intercalantes son empleados hasta ahora, necesitan de su activación por luz UV para la obtención de una clara visualización de fluorescencia y los resultados están sujetos al criterio del evaluador (Ghosh et al.; 2015).

En el año 2015, para hacer más práctico el método LAMP, Tanner incorporó el uso de colorantes sensibles al pH. El empleo de estos colorantes se basa en la acidificación del medio como producto de la liberación de iones hidrogeno durante la síntesis de la cadena naciente de ADN por la ADN polimerasa lo cual produce el viraje del indicador de pH. Además se describe como resultado la obtención de un pH inicial de reacción de 8.8 y un descenso del pH hasta de 6.5 (2 unidades de descenso), que lo convierte en un pH adecuado para la observación clara del viraje de color; siendo uno de los colorantes con óptimo funcionamiento y rango adecuado de viraje, el rojo neutro (Tanner et al.; 2015).

Desde el año 2005 se ha reportado el uso del sistema de Transcripción Reversa -LAMP (RT-LAMP) con fines de investigación para su empleo como método diagnóstico rápido, sensible

y específico del dengue comparado con métodos ya desarrollados como el aislamiento viral o de Transcripción Reversa-PCR (Parida et al.; 2005). En los años posteriores a este, se ha seguido investigando diferentes blancos que mantengan o mejoren la eficiencia del RT-LAMP para la detección y diferenciación del virus dengue con resultados prometedores como los obtenidos por Teoh et al., 2013, el cual reportó una sensibilidad de hasta 100 copias del virus, ninguna reacción cruzada con otros virus relacionados y especificidad del 100% para todos los sets. Todo ello convierte a la técnica LAMP en una alternativa adecuada para la detección del virus dengue en el Perú.

SISTEMAS	PCR Convencional	PCR en tiempo real	LAMP
VENTAJAS	Estándar de oro alternativo al aislamiento	Amplificación simultánea y la detección durante la amplificación exponencial	Amplificación del gen sin requerir termociclador
	Confirmación diagnóstica temprana	Monitoreo en tiempo real de la amplificación	La amplificación puede ser lograda con baño maría /bloque de calentamiento
	Formato de diagnóstico molecular ampliamente utilizado	Cuantitativo, por tanto, útiles para el seguimiento de la carga viral	En tiempo real, así como cualitativo
		Se trabaja en tubo cerrado debido a contaminación	Altamente sensible y específico
		Aumento de la sensibilidad debido a la química fluorescente	Visualización a simple vista. Monitoreo ya sea a través de turbidez o cambio de color
		Rendimiento de análisis alto debido a software	
	Cualitativa	Equipos de alto costo para detección y consumibles	Diseño complicado de cebadores (cuatro cebadores como mínimo)

DESVENTAJAS	Detección de punto final en fase de meseta	Un requisito es la sonda fluorescente	
	Manejo post-PCR	Restringido a laboratorios que no tengan buen apoyo financiero	Restringido a la disponibilidad de reactivos y equipos en algunos países.
	Menos sensible		
	Consumo de tiempo (3-4 horas)		
	Es requisito el uso de termociclador, gel y sistema de documentación		

Tabla 3. Ventajas y desventajas del método de Amplificación Isotérmica Medida por Horquillas (LAMP). (Tomado de Sánchez et al.; 2014)

2.2. HIPOTESIS

Es posible el diseño de cebadores específicos para un sistema LAMP *in house* que permitan la detección diferencial del virus dengue.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. ENFOQUE Y DISEÑO

El presente trabajo es un estudio de tipo experimental para los objetivos de diseñar y seleccionar cebadores de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) específicos para la detección diferencial de los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus dengue. Además, para determinar la sensibilidad y especificidad analítica de dichos cebadores seleccionados.

En resumen, se diseñaron y evaluaron *in silico* cebadores dirigidos hacia genes que codifican para la poliproteína del virus dengue, candidatos adecuados para su detección por LAMP. Para la selección de los cebadores se llevó a cabo una evaluación de cada sistema LAMP realizando la amplificación experimental en condiciones básicas según protocolos establecidos. Se emplearon plásmidos con el *target* para cada serotipo del virus dengue con los cuales se determinaron las condiciones de amplificación óptimas. Finalmente se evaluó la especificidad analítica (ausencia de reacción cruzada) y la sensibilidad analítica (límite de detección) de cada set de cebadores LAMP correspondiente a los serotipos del virus dengue (Figura 9).

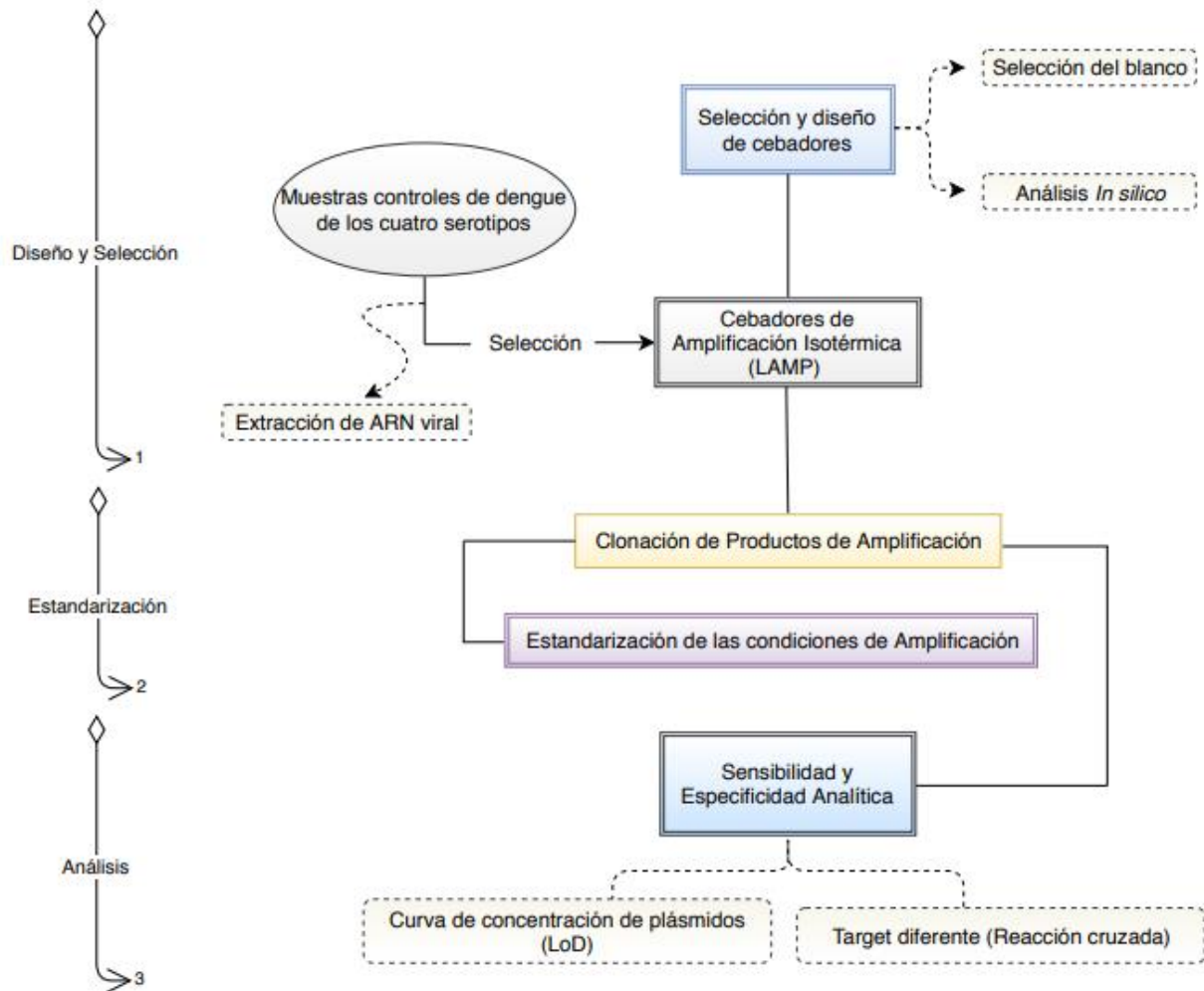


Figura 9. Diseño de estudio. Comprende tres etapas: I) Diseño y selección, análisis bioinformático y reacción LAMP basal; II) Estandarización, clonación de los *target* y optimización de las condiciones de amplificación; III) Análisis, de sensibilidad analítica, determinación del límite de detección (LOD) y especificidad analítica, ausencia de reacción cruzada con virus relacionados.

3.2. MUESTRA DE INVESTIGACIÓN

3.2.1. Controles de estandarización y evaluación de sensibilidad y especificidad analítica

Cuatro muestras controles de los serotipos del virus dengue fueron cedidas por el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), estas muestras fueron empleadas en los

procedimientos de extracción del ARN viral, transcripción reversa, reacción LAMP basal y clonación en un vector plasmídico.

3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

3.3.1. DISEÑO Y SELECCIÓN DE CEBADORES LAMP

3.3.1.1. Análisis de secuencias

Para este fin se llevó a cabo la búsqueda y descarga de las secuencias para cada serotipo del virus dengue de la base de datos de GeneBank perteneciente al *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Fue empleada la herramienta MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (<https://www.megasoftware.net/>) para el alineamiento de las secuencias encontradas para cada serotipo del virus, y con la ayuda de la herramienta bioinformática *GeneDoc* (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/GeneDoc.shtml>) se llevó a cabo la generación de una secuencia consenso para cada serotipo. Se empleó un *software* especialmente diseñado para la generación de cebadores LAMP, el cual incluye características necesarias que deben cumplir dichos oligonucleótidos para poder ser utilizados en este sistema isotérmico (Anexo 1); en esta herramienta denominada *PrimerExplorer V5* (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>), fueron introducidas las secuencias consenso generadas con el alineamiento para la búsqueda de cebadores LAMP; como resultado el programa generó una lista de posibles sets de cebadores LAMP para cada serotipo del virus dengue (Anexo 2).

3.3.1.2. Análisis *in-sílico* y selección de cebadores LAMP

Un análisis de estructuras secundarias y especificidad fue realizado a cada set candidato generado como cebadores LAMP.

3.3.1.2.1. Análisis de estructuras secundarias

Empleando la herramienta bioinformática *OligoAnalyzer* 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), se analizaron estructuras secundarias posiblemente formadas por los cebadores candidatos. Este programa bioinformático permite analizar la formación de *hairpin* y descartar la formación de homodímeros y heterodímeros de cebadores gracias al valor de delta de G calculado para cada estructura secundaria. Si la estructura secundaria tiene un delta de G fuerte (-9 Kcal/mol o más negativo), este oligonucleótido debe ser considerado problemático y rediseñarse, si el valor del delta de G es menor a -9 Kcal/mol se considera un cebador candidato óptimo (Anexo 3).

3.3.1.2.2. Análisis de especificidad

El análisis de especificidad fue realizado utilizando el programa *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Esta herramienta combina *BLAST* con un algoritmo de alineación global para garantizar una alineación completa entre el cebador y el *target* siendo suficientemente sensible para detectar *targets* que presentan un número significativo de *mismatches* (Ye et al., 2012). Con este programa bioinformático se llevó a cabo la verificación del *target* correspondiente a un único serotipo de dengue (Anexo 4).

3.3.1.2.3. Selección de cebadores LAMP

Dentro de los criterios de selección de los cebadores LAMP se tomó en cuenta principalmente i) que la temperatura de hibridación sea entre 53-65°C, ii) que el contenido de GC sea de 30-60% y iii) que el tamaño del producto de amplificación sea menor a 250 nucleótidos. Fueron seleccionados los mejores prospectos *in-silico* los cuales fueron enviados a sintetizar en Invitrogen mediante la empresa BELOMED SRL en Perú. Los cebadores seleccionados fueron mapeados en el genoma viral de

dengue empleando la herramienta *CLC main workbench* (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-main-workbench/>), el que facilitó determinar la región de la poliproteína que constituyó cada blanco de amplificación.

3.3.1.3. Reacción LAMP basal para sets de cebadores seleccionados in-sílco

3.3.1.3.1. Extracción del ARN viral

Usando el Kit *QIAamp® Viral RNA Mini Handbook* de Qiagen, fue realizada la extracción del ARN viral de dengue de las muestras cedidas por el CDC a partir de papel filtro. La extracción fue llevada a cabo siguiendo el protocolo del fabricante (<https://www.qiagen.com/es/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>), todo el proceso fue hecho manualmente. Finalmente, el ARN fue eluído en 60 µL de buffer *AVE* a temperatura ambiente.

3.3.1.3.2. Transcripción reversa del ARN viral

Se emplearon 5 µL del ARN viral extraído de cada serotipo de dengue para la transcripción reversa en un volumen de reacción de 20 µL, usando *random hexamer oligonucleotides* del kit *SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR* de Invitrogen, siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 5). Los ADN complementarios (ADNc) fueron almacenados a -20°C hasta el inicio de los ensayos.

3.3.1.3.3. Reacción de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas

Los componentes de la reacción LAMP: buffer de amplificación (M0537L *New England Biolabs*, Ipswich, MA), MgSO₄ (M0537L *New England Biolabs*, Ipswich, MA), desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs: *New England Biolabs*, Ipswich, MA), colorante rojo neutro (N4638-1G *Neutral Red powder BioReagent* de Sigma Aldrich) y cebadores LAMP (F3, B3, FIP y BIP) fueron colocados a temperatura ambiente,

mientras que la enzima *Bst 2.0 DNA Polymerase* (M0537L New England Biolabs, Ipswich, MA) se mantuvo a una temperatura de -20°C hasta su uso.

Una reacción LAMP basal para cada set de cebadores fue realizada en un volumen final de reacción de 25µL siguiendo el *Typical LAMP Protocol* (<https://www.neb.com/protocols/2014/12/29/typical-lamp-protocol-m0537>), conteniendo buffer isotérmico de amplificación 1X (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Tween 20 pH 8.8 a 25°C), MgSO₄ 8mM, dNTPs 1.4 mM, rojo neutro 0.1%, cebadores FIP y BIP 0.2µM cada uno, cebadores F3 y B3 2µM cada uno, *Bst 2.0 DNA Polymerase* 8U/Rx y 5 µL de muestra control de ADNc de cada serotipo de dengue. La reacción LAMP fue incubada a 60°C por 75 minutos.

Los sets de cebadores LAMP de diseño *in-house* que en la reacción LAMP basal viraron de color amarillo a fucsia dentro de los 75 minutos de incubación únicamente para su serotipo correspondiente (funcionamiento óptimo), fueron seleccionados para un posterior proceso de estandarización de las condiciones de amplificación.

3.3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA DE LOS CEBADORES LAMP

3.3.2.1. Plásmidos controles positivos de ADN

Los ensayos de estandarización de las condiciones de amplificación, sensibilidad y especificidad analítica fueron realizados empleando plásmidos que contenían la región del *target* construido para cada serotipo de dengue según los cebadores LAMP seleccionados.

La secuencia de inserción para cada serotipo del virus dengue fue amplificada con dos cebadores LAMP (cebadores externos F3 y B3) por PCR convencional (Anexo 6), una vez obtenido el producto amplificado fue precipitado con acetato de sodio y etanol (Anexo 7). Utilizando el *Kit TA Cloning® con vector pCR®2.1* de Invitrogen, el producto de PCR pasó a ser clonado por inserción directa en el vector pCR®2.1 utilizando la enzima ADN Ligasa *ExpressLink™ T4*, siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 8). La transformación del ligado fue realizada utilizando bacterias *E.coli* químicamente competentes provistas en el kit, seguido de la siembra de las mismas (Anexo 9). Al concluir el tiempo de incubación (20 horas a 37°C), fueron picadas siete colonias blancas e inoculadas en siete tubos falcon estériles con 3 mL de caldo de cultivo LB (Luria Bertani) más 3µL de ampicilina (100µg/µL concentración final) para su crecimiento a 37°C *overnight*. Posterior al crecimiento se realizó la purificación del ADN plasmídico (Anexo 10). Un PCR convencional y gel de electroforesis fue realizado siguiendo el protocolo citado en el Anexo 3 para asegurar la presencia del *target* en los plásmidos purificados. Los productos resultantes fueron enviados a Macrogen Korea para su respectivo secuenciamiento. Dos tubos estériles de los siete sembrados anteriormente fueron escogidos para transferir 700 µL de las bacterias cultivadas en tubos de 1.5 mL a los que se les agregó glicerol para su criopreservación (-80°C). Cuando se verificó la presencia del *target* de amplificación por medio del secuenciamiento del producto, se realizó la siembra de las colonias criopreservadas en agar LB más ampicilina (incubadas a 37°C *overnight*) y posterior crecimiento en 15 mL de caldo de cultivo LB más ampicilina de las colonias de *E. coli* con el inserto de interés (incubadas a 37°C *overnight*). Finalmente se llevó a cabo la extracción en cantidad mayor utilizando el *GeneJet Plasmid Midiprep kit* siguiendo el protocolo del fabricante (<https://assets.thermofisher.com/TFS->

Assets/LSG/manuals/MAN0012653_GeneJET Plasmid Midiprep UG.pdf) y en un volumen final de elución de 300 µL.

3.3.2.2. Cuantificación de los plásmidos y construcción de paneles de diluciones estándar

Fue realizada una dilución 1/100 de la elución del plásmido extraído para cada serotipo de dengue, esta dilución fue cuantificada por triplicado utilizando QUBIT *dsDNA Hs Assay Kit*. El resultado obtenido fue extrapolado para determinar la concentración (ng/µL) de ADN del stock inicial. Para la extrapolación fue multiplicado el valor de lectura de QUBIT por el factor de dilución.

Luego de obtener estos datos, se diluyó cada stock de plásmido hasta una concentración de 2 ng/µL aproximadamente. A partir de esta concentración se realizó diluciones seriadas 1:10 hasta la dilución 2×10^{-9} para los plásmidos de cada serotipo del virus dengue obtenidos. Con estas curvas estándar se realizó una placa de PCR en tiempo real (qPCR). Para cada serotipo las curvas fueron colocadas por triplicado y los resultados fueron empleados para realizar una cuantificación relativa y obtener el número de copias aproximadas por µL de ADN plasmídico.

La cuantificación relativa fue realizada mediante la siguiente fórmula:

$$[Xi] = \frac{[Yi] \times Ey^{Cqy}}{Ex^{Cqx}}$$

Donde:

[Xi]= Concentración del ADN plasmídico de DENV en copias/µL; [Yi]= Concentración de ADN obtenida de Plasmodium; Ey= Eficiencia del qPCR obtenida para Plasmodium; Cqy= Ciclo de amplificación en la concentración “y” de Plasmodium; Ex= Eficiencia del qPCR obtenida para cada serotipo de DENV; y Cqx= Ciclo de amplificación en la concentración “x” de DENV.

Finalmente, los stocks fueron alicuotados cada 15 μ L y separadas en falcon de 15mL según su respectivo serotipo para la preparación de los paneles de diluciones estándar.

3.3.2.3. Preparación de paneles de diluciones estándar

90 μ L de agua de grado molecular en tubos de 1.5 mL más 10 μ L de ADN plasmídico alicuotado (~ 2 ng/ μ L), constituyó la primera dilución que dio origen a ocho diluciones seriadas 1:10 las cuales conformaban los paneles de diluciones estándar para cada serotipo del virus dengue.

Los paneles estándar fueron empleados por 2 días como máximo y posteriormente contruidos nuevos paneles.

3.3.2.4. Estandarización de las condiciones de amplificación

Los paneles de diluciones estándar fueron empleados para estandarizar las condiciones de amplificación de los cebadores LAMP de diferenciación del virus dengue; éstas condiciones fueron determinadas por:

- i. Concentración de buffer ([buffer]): Fueron probadas las concentraciones de 1X, 0.5X y 0.25X, para determinar una concentración en la cual el viraje del indicador sensible al pH pueda verse adecuadamente debido a la capacidad amortiguadora del buffer.
- ii. Concentración de MgSO_4 ([MgSO_4]): Fueron probadas las concentraciones de 6 mM, 7 mM y 8 mM. En algunos casos teniendo como guía la reacción LAMP basal se ajustó la concentración de magnesio a un rango medio entre las concentraciones 5 mM y 6 mM.
- iii. Colorante indicador de pH: Fueron probadas las concentraciones 0.003%, 0.004% y 0.008% de rojo neutro. La concentración adecuada del indicador fue

determinada por la facilidad de visualización del cambio de color (amarillo a fucsia).

- iv. Concentración de cebadores ([F3B3/FIPBIP]): La proporción entre los cebadores externos e internos fue determinada evaluando las concentraciones 0.2 μM /2 μM , 0.4 μM /4 μM y 0.2 μM /4 μM .
- v. Concentración de enzima *Bst* 2.0: Fueron evaluadas las concentraciones de 4U/Rx, 8U/Rx, 10U/Rx y 12U/Rx.

Las condiciones en las que cada set de cebadores viró correctamente de color amarillo a fucsia dentro del tiempo de incubación, fueron determinadas como las condiciones estandarizadas de amplificación en la reacción LAMP.

3.3.3. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

3.3.3.1. Sensibilidad Analítica

En esta etapa fue empleado el panel de diluciones estándar 1:10 de plásmidos conteniendo el *target* para cada serotipo con un número de copias conocido generado también para la fase de estandarización. La sensibilidad analítica de los cebadores LAMP fue determinada en dos fases: en la primera fase fue evaluado el LoD_6 , para lo cual cada dilución estándar fue replicada 12 veces, la última dilución donde todas las réplicas fueron positivas al *target* fue considerada como el LoD_6 del set de cebadores. En la segunda fase se llevó a cabo la determinación del $\text{LoD}_{95\%}$ empleando el LoD_6 obtenido anteriormente para cada set de cebadores más una dilución 1:5 anterior al LoD_6 y una dilución 1:5 y 1:2 menor a este. Finalmente, estas cuatro diluciones fueron replicadas 30 veces. La dilución donde el 95% de las réplicas fueron positivas al *target* fue considerada como el $\text{LoD}_{95\%}$, siendo este determinado mediante una ecuación de regresión logística

binomial empleando la función “*glm*” del paquete “*stats*” en “R” v 3.2.2. Para cada set de cebadores de los serotipos del virus dengue se obtuvo gráficamente una curva de regresión que permitió en esta segunda etapa establecer un límite de detección con el 95% de nivel de confianza.

3.3.3.2. Especificidad Analítica

La especificidad analítica de los cebadores LAMP de diferenciación, fue evaluada dentro de los cuatro serotipos del virus dengue y contra otros dos arbovirus estrechamente relacionados, zika y chikungunya proporcionados por el CDC, arbovirus causantes de enfermedades febriles con sintomatología similar a la causada por el virus dengue. La especificidad de los cebadores se comprobó al observarse un patrón similar al observado en el blanco de reacción en las cinco réplicas realizadas por duplicado.

3.3.4. EVALUACIÓN DE UN GRUPO DE MUESTRAS

Fue realizado adicionalmente, el análisis de un grupo de 106 muestras de suero de pacientes febriles provenientes de Piura e Iquitos, las cuales primero fueron diagnosticadas empleando PCR en tiempo real (protocolo estandarizado en laboratorio). Previo a ello, las muestras pasaron un proceso de extracción de ARN empleando el *QIAamp Viral RNA Mini Kit* de QIAGEN y transcripción empleando el *First strand cDNA synthesis kit-Roche*, con el que se obtuvo el ADNc para el PCR en tiempo real.

Posteriormente fue realizada la detección diferencial de dengue mediante LAMP a las muestras, usando únicamente el ARN extraído de los sueros. Fueron empleadas las concentraciones estandarizadas de enzima *BST 2.0* para cada set de cebadores, una enzima adicional de reverso transcripción denominada *AMV* a una concentración de 1U/Rx y 5 µL de ARN de la muestra para cada reacción. El diseño del LAMP incluyó al final de cada *strip*

de 8 pocillos, un blanco de reacción y un control positivo del serotipo correspondiente. Los seis primeros pocillos contenían las muestras a diagnosticar.

Esta evaluación permitió de manera preliminar conocer si los cebadores LAMP diseñados en este trabajo de investigación diagnosticaban correctamente las muestras positivas al PCR en tiempo real estandarizado y si mantenían como negativas a las muestras que no presentaban el *target* a ningún serotipo.

3.3.5. ASPECTOS ÉTICOS

El presente proyecto forma parte del desarrollo del “Círculo para la implementación de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial y TICs para la vigilancia de zika, dengue, chikungunya y malaria”. denominada “*Elaboración de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial para zika, dengue, chikungunya y malaria*”. Este estudio, cuenta con aprobación por el Comité de Ética de la UPCH con el código de inscripción 100405 (Anexo 11).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. GENERACIÓN DE CEBADORES LAMP CANDIDATOS, ANALISIS *IN-SILICO* Y SELECCIÓN.

Fueron diseñados en total 4 sets de cebadores LAMP para DENV-1 (Tabla 4), 10 sets de cebadores LAMP para DENV-2 (Tabla 5), 8 sets de cebadores LAMP para DENV-3 (Tabla 6) y 6 sets de cebadores LAMP para DENV-4 (Tabla 7).

En cuanto al análisis *in silico* se tuvo en cuenta que el producto de los cebadores externos F3 y B3 sea ~250 pares de bases, que la temperatura de hibridación sea entre 53°C y 65°C y se determinó mantener un ΔG que no sobrepasara el valor de -9Kcal/mol para formación de *hairpin* y estructuras secundarias (homodímeros y heterodímeros) tal como sucede en los sets con valores en color rojo (Tabla 4, 5, 6 y 7) cuyos ΔG sobrepasaron el valor establecido, aumentando la probabilidad de formación de las estructuras secundarias.

De acuerdo a estas premisas los sets de cebadores LAMP seleccionados para cada serotipo fueron: DENV-1, sets de cebadores 3 y 4 (Tabla 4); DENV-2, sets de cebadores 7, 8 y 10 (Tabla 5); DENV-3, sets de cebadores 1, 4 y 6 (Tabla 6); DENV-4, sets de cebadores 2 y 5 (Tabla 7).

Estos sets fueron enviados a sintetizar a Invitrogen mediante la empresa BELOMED SRL, para su evaluación en una reacción LAMP basal. Se obtuvieron los sets de cebadores LAMP con desempeño óptimo para la detección de cada serotipo del virus dengue, los cuales se resumen en la tabla 8.

Se determinó la región NS5 de la poliproteína del virus como ubicación del *target* para los cebadores de DENV-1 y DENV-3, la región NS3 de la poliproteína para los cebadores de DENV-2 y la región 3'UTR para los cebadores DENV-4; el esquema de ubicación puede ser observado en el Anexo 12.

Tabla 4. Análisis *in-silico* de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-1: Especificidad y estructuras secundarias

DENV-1			<i>Primer-BLAST</i> (NCBI)				<i>OligoAnalyzer</i> (IDT)		
Número de set	<i>Primer</i>	Secuencia 5'--> 3'	Tm	Tamaño de producto	%GC	Especificidad	<i>Hairpin</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)	<i>Homodimero</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)	<i>Heterodimero</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)
1	F3	CGTGGGGACGTAAAAACCTG	59.13	204	55.00	DENV-1 Y DENV-3	-0.01	-6.30	-8.09
	B3	CTCTCCCAGCGTCAATATGC	58.49		55.00		0.06	-3.91	
	F2	GAGGCTGCAAACTGTGGA	57.52	160	55.56		0.07	-7.05	-10.32
	B2	TTTTTGTTTGCGGGGGGT	57.95		50.00		1.13	-3.61	
2	F3	GCTGAAATTGCGTGACTCCT	58.84	211	50.00	DENV-1	0.86	-5.36	-3.90
	B3	TTCCAAGACTCCATTGCTCC	57.50		50.00		0.55	-3.90	
	F2	ACACCCAAATGTGTGACCAC	58.60	160	50.00		-1.32	-4.64	-6.97
	B2	GATCTTGGCCAGATGCATGT	58.31		50.00		-1.18	-13.19	
3	F3	AGAGCATGGAACATTTGGGA	57.09	235	45.00	DENV-1	-0.91	-5.38	-6.57
	B3	GCCAGATGCATGTCTTCACT	58.25		50.00		-0.65	-10.00	
	F2	TGGGTTTGGAGTTTTCACGA	57.58	165	45.00		0.16	-3.61	-6.60
	B2	GCTAGCTTCCAGGTCTCGT	58.81		57.89		0.84	-10.44	
4	F3	GATGAACTTGTGGGTAGGGCTAGA	61.66	293	50.00	DENV-1	0.67	-4.16	-5.02
	B3	TGGGTTTTGTCCTCCATC	53.99		50.00		-0.10	-5.02	
	F2	CCACAGGAGAGACCTGAGAC	58.82	141	60.00		-4.17	-6.62	-4.64
	B2	TTCCACACTGACAGCATGTC	58.12		50.00		-2.13	-5.38	

Tabla 5. Análisis *in-silico* de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-2: Especificidad y estructuras secundarias

DENV-2			<i>Primer-BLAST</i> (NCBI)				<i>OligoAnalyzer</i> (IDT)		
Número de set	<i>Primer</i>	Secuencia 5'--> 3'	Tm	Tamaño de producto	%GC	Especificidad	<i>Hairpin</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)	<i>Homodimero</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)	<i>Heterodimero</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)
1	F3	TGTAGCTCCACCTGAGAAGG	58.44	222	55.00	DENV-2	-2.34	-6.34	-4.74
	B3	GGTCTTTCCAGCGTCAAT	57.75		52.63		0.09	-3.61	
	F2	AAAAAATCTGGGAGGCCACA	57.60	161	45.00		-1.02	-9.28	-6.24
	B2	GGGGGTCTCCTCTAACCTC	57.77	74	63.16		-0.64	-4.41	
2	F3	GCCACAAACCATGGAAGCT	58.65	219	52.63	DENV-2	-1.2	-11.52	-5.02
	B3	CCTGGAATGATGCTGAGGAG	57.74		55.00		0.13	-4.67	
	F2	CATGGCGTAGTGGACTAGC	57.73	170	57.89		-0.01	-5.38	-5.02
	B2	AGGATCTCTGGTCTTTCCCA	57.35		50.00		-0.53	-5.02	
3	F3	TACGCATGGCGTAGTGGA	58.39	209	55.56	DENV-2 Y DENV-4	-3.37	-9.05	-8.09
	B3	GCGTTCTGTGCCTGGAAT	58.01		55.56		-0.11	-3.61	
	F2	CGGTTAGAGGAGACCCCTC	58.19	159	63.16		-2.38	-6.24	-7.58
	B2	GCAGGATCTCTGGTCTTTCC	57.68	66	55.00		-1.47	-4.64	
4	F3	GGGTAGGCTTCCAAC TTCA	57.42	201	50.00	DENV-2	-0.1	-3.14	-6.14
	B3	CCCCTTCCGCTCATCAAGA	59.09		57.89		-0.14	-3.61	
	F2	AAGAGACGCACTGGACA ACT	59.25	133	50.00		0.06	-3.61	-6.62
	B2	CGTGACTGTAGCCAGAAGTG	58.30		55.00		-1.71	-3.61	
5	F3	CCACTGGCGCTAAAGGAATT	58.54	240	50.00	DENV-2	0.46	-9.89	-9.76
	B3	CGTGACTGTAGCCAGAAGTG	58.30		55.00		-1.71	-3.61	
	F2	GAAAGTCCCTGACCCTGAAC	57.81	168	55.00		-0.17	-2.92	-12.61
	B2	ATGTCTCCAGGGTCTCCG	57.64		61.11		0.17	-3.61	

Tabla 5'. Análisis *in-silico* de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-2: Especificidad y estructuras secundarias

DENV-2			<i>Primer-BLAST</i> (NCBI)				<i>OligoAnalyzer</i> (IDT)		
Número de set	<i>Primer</i>	Secuencia 5'--> 3'	Tm	Tamaño de producto	%GC	Especificidad	<i>Hairpin</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)	<i>Homodimero</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)	<i>Heterodimero</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)
6	F3	GGGTAGGCTTCCAACCTTTCA	57.42	201	50.00	DENV-2	-0.1	-3.14	-6.14
	B3	CCCCTTCCGCTCATCAAGA	59.09		57.89		-0.14	-3.61	
	F2	GACTCAGAAGGCAAGAGACG	58.01	145	55.00		-1.18	-3.61	-6.21
	B2	CGTGACTGTAGCCAGAAGTG	58.30		55.00		-1.71	-3.61	
7	F3	CAAGAGACGCACTGGACAA	57.71	197	52.63	DENV-2	0.06	-3.61	-6.62
	B3	GCACATTCCCAGGGTCATC	58.20		57.89		0.72	-6.14	
	F2	CTTAGCAGTGCTGCACACG	59.51	157	57.89		-2.82	-7.05	-4.74
	B2	CCCTATACCCCTTCCGCT	57.36		61.11		-	-3.61	
8	F3	GGGAGAATAGGAAGAAATCCAA	55.21	199	40.91	DENV-2	-2	-4.64	-5.95
	B3	AACGGTATTCACCATCAATG	53.67		40.00		-1.42	-4.41	
	F2	GTACATATACATGGGGGAACC	55.22	141	47.62		-1.22	-5.38	-5.02
	B2	GCATCCACTTTTTCACGC	55.16		50.00		1.37	-3.61	
9	F3	GGAGCCGGAGTTTACAAAGA	57.53	226	50.00	DENV-2	-7.1	-9.75	-12.99
	B3	TCGTTTGGACGGCTCTTG	57.65		55.56		-1.86	-4.95	
	F2	TACAATGTGGCACGTCACAC	58.78	163	50.00		-1.61	-6.30	-10.12
	B2	TTCCAATGCCAGGACTTGG	57.64		52.63		-1.29	-6.97	
10	F3	GTCCCTGACCCTGAACCTAA	58.35	231	55.00	DENV-2	0.36	-2.92	-3.53
	B3	CCCCTTCCGCTCATCAAGA	59.09		57.89		-0.14	-3.61	
	F2	GGGTAGGCTTCCAACCTTTCA	57.42	166	50.00		-0.1	-3.14	-7.81
	B2	CGTGACTGTAGCCAGAAGTG	58.30		55.00		-1.71	-3.61	

Tabla 6. Análisis *in-silico* de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-3: Especificidad y estructuras secundarias

DENV-3			<i>Primer-BLAST</i> (NCBI)				<i>OligoAnalyzer</i> (IDT)		
Número de set	<i>Primer</i>	Secuencia 5'--> 3'	Tm	Tamaño de producto	%GC	Especificidad	<i>Hairpin</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)	<i>Homodimero</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)	<i>Heterodimero</i> ΔG (kcal.mole ⁻¹)
1	F3	GTACGCACGGTGTAGCAG	58.24	203	61.11	DENV-3	-0.51	-3.65	-6.44
	B3	TCTGTGCCTGGAATGATGC	57.82		52.63		0.55	-3.14	
	F2	GAGACCCCTCCCATGACA	57.52	147	61.11		-0.14	-5.38	-5.02
	B2	AGACAGCAGGATCTCTGGT	57.29		52.63		-1.47	-4.62	
2	F3	CAGAGGGAGCCATTTGGTAA	57.19	230	50.00	DENV-3	-0.65	-5.02	-4.74
	B3	TACACCGTGCGTACAGCT	58.64		55.56		-1.34	-6.34	
	F2	ACTGTCAGGCCACATTAAGC	58.17	156	50.00		0.54	-9.28	-7.81
	B2	AGCCTCCCAGGCTTTACG	59.01		61.11		-3.05	-9.41	
3	F3	GGGACGTAAAGCCTGGGA	58.60	212	61.11	DENV-3	0.42	-6.30	-6.62
	B3	GCAGGATCTCTGGTCTCTCC	58.96		60.00		-1.47	-4.64	
	F2	AAGCTGTACGCACGGTGTA	59.34	143	52.63		-1.12	-6.34	-8.70
	B2	TTTTTGTTTGCGGGGGGT	57.95		50.00		1.13	-3.61	
4	F3	GGGACGTAAAGCCTGGGA	58.60	212	61.11	DENV-3	0.42	-6.30	-6.62
	B3	GCAGGATCTCTGGTCTCTCC	58.96		60.00		-1.47	-4.64	
	F2	CAAACCGTGGAAGCTGTACG	59.49	153	55.00		-0.49	-6.34	-7.18
	B2	TTTTTGTTTGCGGGGGGT	57.95		50.00		1.13	-3.61	

Tabla 6'. Análisis *in-silico* de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-3: Especificidad y estructuras secundarias

DENV-3			<i>Primer-BLAST</i> (NCBI)				<i>OligoAnalyzer</i> (IDT)		
Número de set	<i>Primer</i>	Secuencia 5'--> 3'	Tm	Tamaño de producto	%GC	Especificidad	<i>Hairpin</i> ΔG (kcal.mole-1)	<i>Homodimero</i> ΔG (kcal.mole-1)	<i>Heterodimero</i> ΔG (kcal.mole-1)
5	F3	TGCGTAGTGAAACCAATCGA	57.56	211	45.00	DENV-3	-0.37	-6.76	-5.19
	B3	TTAGTTCGTCCTGGGGTCT	57.22		52.63		0.72	-3.61	
	F2	CTAATGCCCTGCTCGCTC	57.96	161	61.11		0.01	-3.61	-12.83
	B2	GCAGGGAACCACCAACTT	57.40		55.56		-1.77	-3.14	
6	F3	ATTGCGTAGTGAAACCAATC	54.30	216	40.00	DENV-3	0.3	-5.37	-5.02
	B3	CTATTAGTTCGTCCTGGGGT	56.04		50.00		0.72	-3.61	
	F2	ACGATATGGGAAAGGTTCGG	57.39	140	50.00		-0.97	-5.19	-7.93
	B2	GCAGGGAACCACCAACTT	57.40		55.56		-1.77	-3.14	
7	F3	TGCGTAGTGAAACCAATCGA	57.56	211	45.00	DENV-3	-0.37	-6.76	-5.19
	B3	TTAGTTCGTCCTGGGGTCT	57.22		52.63		0.72	-3.61	
	F2	CTAATGCCCTGCTCGCTC	57.96	161	61.11		0.01	-3.61	-12.83
	B2	GCAGGGAACCACCAACTT	57.40		55.56		-1.77	-3.14	
8	F3	CCTGTCTGGGGAAGTCCTA	57.29	191	57.89	DENV-2 Y DENV-3	-0.64	-4.64	-9.54
	B3	CCTGTTCCAGACTGTCAACA	57.38		50.00		-0.54	-5.24	
	F2	CGCTCAAATGTGGAGCCT	57.69	132	55.56		-2.05	-6.31	-6.75
	B2	TCATGTGTGGCGTGTATGG	57.85		52.63		-0.14	-5.38	

Tabla 7. Análisis *in-silico* de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-4: Especificidad y estructuras secundarias

DENV-4			Primer-BLAST (NCBI)				OligoAnalyzer (IDT)		
Número de set	Primer	Secuencia 5'--> 3'	Tm	Tamaño de producto	%GC	Especificidad	Hairpin ΔG (kcal.mole ⁻¹)	Homodimero ΔG (kcal.mole ⁻¹)	Heterodimero ΔG (kcal.mole ⁻¹)
1	F3	CGCGTGGCATATTGGACTA	57.72	202	52.63	DENV-4 Y DENV-2	-0.01	-10.36	-8.16
	B3	TGCCTGGATTGATGTTGCA	57.64		47.37		-0.01	-7.05	
	F2	CGGTTAGAGGAGACCCCTC	58.19	159	63.16		-2.38	-6.24	-7.58
	B2	GCAGGATCTCTGGTCTTTCC	57.68	66	55.00		-1.47	-4.64	
2	F3	CGCGTGGCATATTGGACTA	57.72	204	52.63	DENV-4	-0.01	-10.36	-8.16
	B3	TGCCTGGATTGATGTTGCA	57.64		47.37		-0.01	-7.05	
	F2	AGACCCCTCCCATCACTG	57.51	147	61.11		0.84	-1.95	-7.58
	B2	GCAGGATCTCTGGTCTTTCC	57.68		55.00		-1.47	-4.64	
3	F3	CGCGTGGCATATTGGACTA	57.72	210	52.63	DENV-4	-0.01	-10.36	-8.16
	B3	GCTCTGTGCCTGGATTGATG	58.98		55.00		-0.34	-3.14	
	F2	CGGTTAGAGGAGACCCCTC	58.19	158	63.16		-2.38	-6.24	-7.58
	B2	GCAGGATCTCTGGTCTTTCC	57.68	66	55.00		-1.47	-4.64	

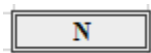
Tabla 7'. Análisis *in-silico* de cebadores LAMP diseñados hacia el serotipo DENV-4: Especificidad y estructuras secundarias

DENV-4			<i>Primer-BLAST</i> (NCBI)				<i>OligoAnalyzer</i> (IDT)		
Número de set	<i>Primer</i>	Secuencia 5'--> 3'	Tm	Tamaño de producto	%GC	Especificidad	<i>Hairpin</i> ΔG (kcal.mole-1)	<i>Homodimero</i> ΔG (kcal.mole-1)	<i>Heterodimero</i> ΔG (kcal.mole-1)
4	F3	CGCGTGGCATATTGGACTA	57.72	202	52.63	DENV-4	-0.01	-10.36	-8.16
	B3	TGCCTGGATTGATGTTGCA	57.64	177	47.37		-0.01	-7.05	
	F2	CGGTTAGAGGAGACCCCTC	58.19	154	63.16		-2.38	-6.24	-7.58
	B2	GCAGGATCTCTGGTCTTTCC	57.68	67	55.00		-1.47	-4.64	
5	F3	CTTGTGCCACGGCTTGAG	59.05	187	61.11	DENV-4	-1.22	-6.21	-8.16
	B3	AGCTTCCTCCTGGCTTCG	59.01		61.11		0.24	-6.34	
	F2	CAAACCGTGCTGCCTGTA	57.94	141	55.56		1.03	-3.61	-5.84
	B2	TTGCTGCGTTTTGTCAGTGA	58.91		45.00		-0.33	-3.61	
6	F3	CGCGTGGCATATTGGACTA	57.72	204	52.63	DENV-4	-0.01	-10.36	-8.16
	B3	TGCCTGGATTGATGTTGCA	57.64		47.37		-0.01	-7.05	
	F2	AGACCCCTCCCATCACTG	57.51	148	61.11		0.84	-1.95	-7.58
	B2	GCAGGATCTCTGGTCTTTCC	57.68		55.00		-1.47	-4.64	

Leyenda:



Sombreado gris: Cebadores LAMP seleccionados luego del análisis *in-silico* y enviados a sintetizar.



En negrita: Cebadores LAMP de diferenciación para cada serotipo del virus dengue.

Tabla 8. Cebadores LAMP de diferenciación para los cuatro serotipos del virus dengue

Serotipo de dengue	Región del target	Dirección	Primer	Secuencia 5'--> 3'	Tamaño de primer (nt)
DENV-1	NS5	Forward	F3	GATGAACTTGTGGGTAGGGCTAGA	24
			FIP	ACCCAATCAACTGGAACGGCTG- CCACAGGAGAGACCTGAGAC	22-20
		Reverse	B3	TGGGTTTTGTCCTCCATC	18
			BIP	CCTGGTCGATCCATGCCCATC-TTCCACACTGACAGCATGTC	21-20
DENV-2	NS3	Forward	F3	GGGAGAATAGGAAGAAATCCAA	22
			FIP	TAGCTTCTTTCCAATGTGCACA- GTACATATACATGGGGGAACC	22-21
		Reverse	B3	AACGGTATTCACCATCAATG	20
			BIP	TGCTCCTAGATAACATCAACACAC- GCATCCACTTTTTTCACGC	24-18
DENV-3	NS5	Forward	F3	ATTGCGTAGTGAAACCAATC	20
			FIP	TGTTGCCAATCATGCCATCCCT- ACGATATGGGAAAGGTTTCGG	22-20
		Reverse	B3	CTATTAGTTCGTCCTGGGGT	20
			BIP	G TTCCTTTCTGCTCCCACCACT-GCAGGGAACCACTT	22-18
DENV-4	3'UTR	Forward	F3	CTTGTGCCACGGCTTGAG	18
			FIP	GCATGGCCTCCCTAGGGATTTC-CAAACCGTGCTGCCTGTA	22-18
		Reverse	B3	AGCTTCCTCCTGGCTTCG	18
			BIP	TGTACGCGTGGCATATTGGACT- TTGCTGCGTTTTGTCAGTGA	22-20

4.1.2. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS CEBADORES LAMP DE DIFERENCIACIÓN

Respecto al volumen de muestra, se determinó el empleo de 5 µL de ADNc o ADN plasmídico en un volumen total de reacción de 25 µL. Las condiciones y concentraciones estandarizadas se resumen en la tabla 9.

El viraje de la reacción LAMP fue establecido por un color inicial de reacción amarillo-naranja. Un color final de reacción rosa o al cabo de 60 minutos se consideró como una muestra positiva mientras un color final igual al de la reacción inicial determinó una muestra negativa. Además, se determinó un rango de 15 minutos después del tiempo de incubación estandarizado (60 minutos), en el cual los cuatro sets de cebadores mantuvieron los resultados sin alteraciones.

Tabla 9. Condiciones de amplificación isotérmica estandarizadas para los cebadores LAMP de diferenciación del virus dengue.

Reactivos en la reacción LAMP	Primers DENV-1	Primers DENV-2	Primers DENV-3	Primers DENV-4
<i>Buffer de amplificación</i>	0.5X	0.5X	0.5X	0.5X
<i>MgSO₄*</i>	6 mM total	5.5 mM total	5.5 mM total	5.5 mM total
<i>dNTP</i>	1.4 mM c/u	1.4 mM c/u	1.4 mM c/u	1.4 mM c/u
<i>Rojo Neutro</i>	0.003%	0.003%	0.003%	0.003%
<i>F3</i>	0.2 µM	0.2 µM	0.4 µM	0.2 µM
<i>B3</i>	0.2 µM	0.2 µM	0.4 µM	0.2 µM
<i>FIP</i>	4 µM	2 µM	4 µM	2 µM
<i>BIP</i>	4 µM	2 µM	4 µM	2 µM
<i>Bst 2.0 DNA polymerase</i>	12 U/Rx	10 U/Rx	12 U/Rx	10 U/Rx
<i>Temperatura de incubación</i>	60°C			
<i>Tiempo de incubación</i>	60 minutos			

* Concentración de sulfato de magnesio total, contando 1mM de MgSO₄ aportado por el buffer de amplificación isotérmica.

4.1.3. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

4.1.3.1. SENSIBILIDAD ANALÍTICA

ETAPA I: Determinación del LoD₆ para los sets de cebadores LAMP

Se determinó el LoD₆ empleando los paneles de diluciones estándar contruidos con los plásmidos conteniendo el *target* para cada serotipo del virus dengue (Tabla 10, 11, 12 y 13). El LoD₆ (última dilución con 100% de reproducibilidad) para DENV-1 fue 1 123.93 Copias/μL, para DENV-2 fue 2 620.64 Copias/ μL, para DENV-3 fue 186 488.50 Copias/μL y para DENV-4 fue 228.36 Copias/μL (Anexo 13).

Tabla 10. Panel de diluciones estándar para DENV-1. Concentración de ADN plasmídico, equivalencia a copias/ μL y determinación del LoD₆.

DENV-1		Replicas para determinar LoD ₆											
Dilución	Copias/μL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	112,392,800.68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	11,239,280.07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	1,123,928.01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	112,392.80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	11,239.28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	1,123.93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	112.39	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	11.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LoD₆		1 123.93 Copias/μL											

* Réplicas positivas: +, réplicas negativas: -

Tabla 11. Panel de diluciones estándar para DENV-2. Concentración de ADN plasmídico, equivalencia a copias/ μL y determinación del LoD₆.

DENV-2		Replicas para determinar LoD ₆											
Dilución	Copias/μL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	262,064,453.44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	26,206,445.34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	2,620,644.53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	262,064.45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5	26,206.45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	2,620.64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	262.06	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	26.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LoD₆		2 620.64 Copias/μL											

* Réplicas positivas: +, réplicas negativas: -

Tabla 12. Panel de diluciones estándar para DENV-3. Concentración de ADN plasmídico, equivalencia a copias/ μL y determinación del LoD₆.

DENV-3		Replicas para determinar LoD ₆											
Dilución	Copias/μL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	186,488,500.29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	18,648,850.03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	1,864,885.00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	186,488.50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	18,648.85	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6	1,864.89	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	186.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	18.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LoD₆		186 488.50 Copias/μL											

* Réplicas positivas: +, réplicas negativas: -

Tabla 13. Panel de diluciones estándar para DENV-4. Concentración de ADN plasmídico, equivalencia a copias/ μL y determinación del LoD₆.

DENV-4		Replicas para determinar LoD ₆											
Dilución	Copias/μL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	228,364,313.71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	22,836,431.37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	2,283,643.14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	228,364.31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	22,836.43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	2,283.64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	228.36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	22.84	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LoD₆		228.36 Copias/μL											

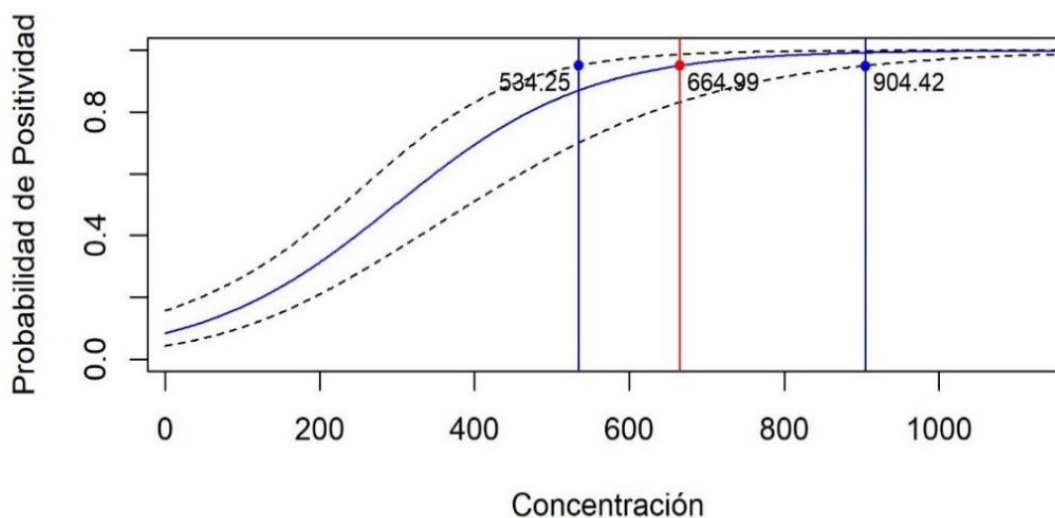
* Réplicas positivas: +, réplicas negativas: -

ETAPA II: Determinación del $LoD_{95\%}$ para los sets de cebadores LAMP

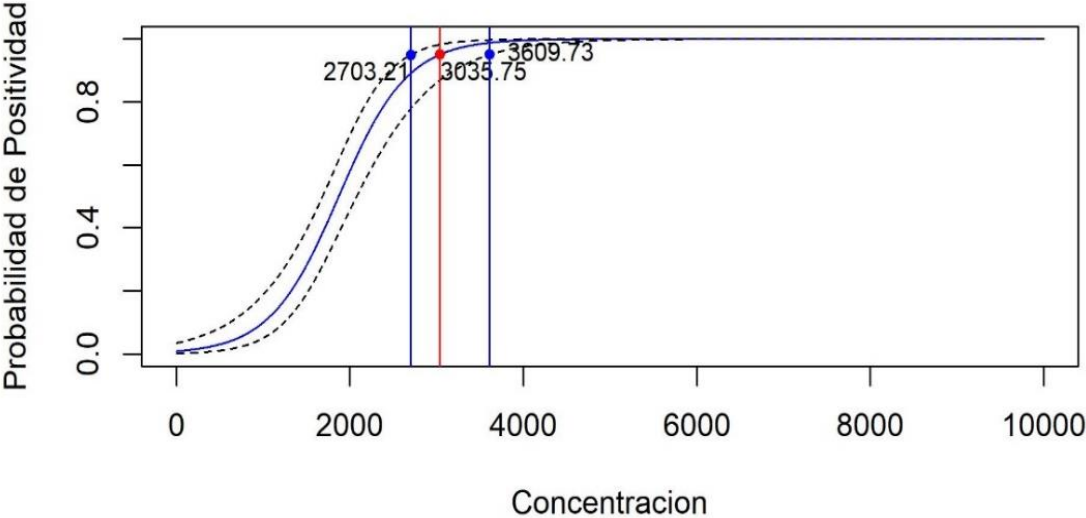
Los cebadores LAMP para DENV-1 y DENV-2 detectaron hasta 200 copias/ μ L en un tiempo de 60 ± 5 min. Los cebadores LAMP para DENV-3 detectaron hasta 2000 copias/ μ L en un tiempo de 60 ± 10 min, mientras que los cebadores LAMP para DENV-4 detectaron hasta 40 copias/ μ L en un tiempo de 60 ± 5 min; sin embargo, esta cantidad fue obtenida en una media de 5 a 8 de las 30 réplicas.

Considerando las 30 réplicas para cada set de cebadores LAMP, las curvas de regresión logística binomial presentadas en la Figura 10 revelaron que el límite de detección con 95% de nivel de confianza fue de 664.99 copias/ μ L con un intervalo de confianza de 534.24 hasta 904.42 copias/ μ L para los cebadores de DENV-1; 3035.75 copias/ μ L con un intervalo de confianza de 2703.21 hasta 3609.73 copias/ μ L para los cebadores de DENV-2; 118921.88 copias/ μ L con un intervalo de confianza de 93282.37 hasta 196476.8 copias/ μ L para los cebadores de DENV-3 y 207.65 copias/ μ L con un intervalo de confianza de 168.2 hasta 302.03 copias/ μ L para los cebadores de DENV-4.

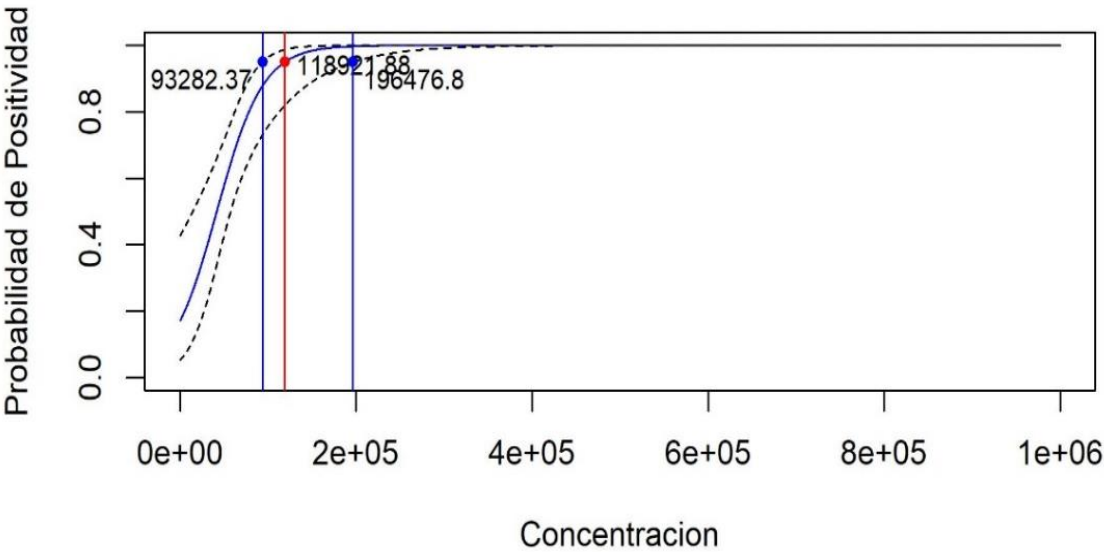
A)



B)



C)



D)

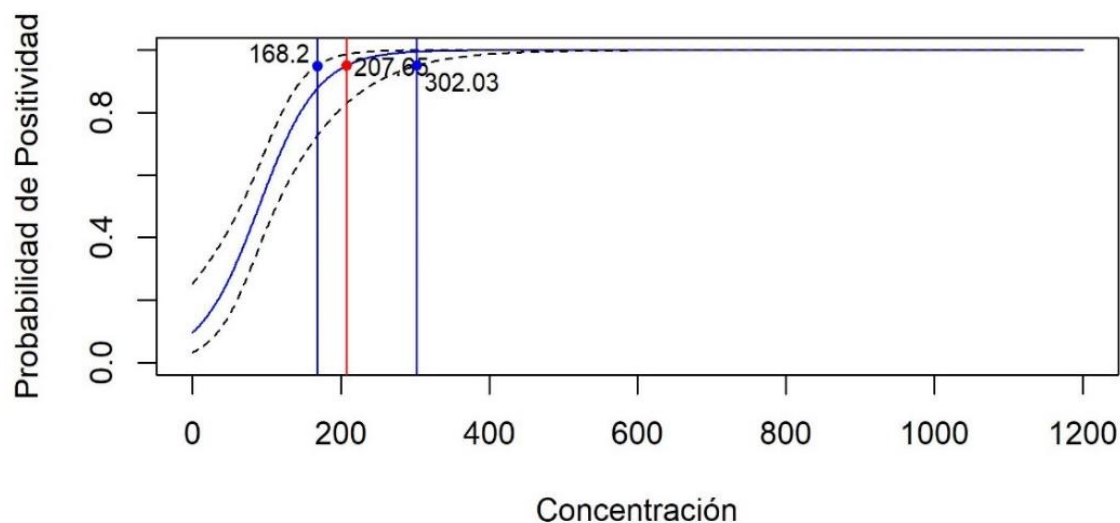


Figura 10. Curvas de regresión logística binomial para determinación del $LoD_{95\%}$ de los sets de cebadores LAMP. Las curvas muestran la asociación entre la concentración en copias/ μ L de los plásmidos y la probabilidad de positividad de la reacción LAMP para los sets de cebadores de cada serotipo del virus dengue. La curva azul de línea continua representa el límite de detección al 95% de nivel de confianza, valor representado por el punto rojo. Las curvas de líneas punteadas representan el intervalo de confianza superior e inferior, valores representados por los puntos azules. A) $LoD_{95\%}$ DENV-1; B) $LoD_{95\%}$ DENV-2; C) $LoD_{95\%}$ DENV-3 y D) $LoD_{95\%}$ DENV-4.

4.1.3.2. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Cada set de cebadores LAMP reaccionó específicamente hacia su *target*, no mostró reacción cruzada con los otros serotipos del virus dengue, tampoco con virus relacionados a la sintomatología de la enfermedad como zika y chikungunya, además el blanco de amplificación se mantuvo negativo durante el tiempo de incubación (Anexo 14). La especificidad analítica entonces fue del 100% para los cuatro sets de cebadores LAMP de diferenciación del virus dengue.

Tabla 14. Especificidad analítica de los cebadores LAMP de diferenciación de dengue.

Sets de Cebadores	Replicas	Muestra ADNc											
		DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4		Zika		Chick*	Bx*
DENV-1	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DENV-2	1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
DENV-3	1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
DENV-4	1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Chick * referido al virus chikungunya y Bx referido al blanco de amplificación.

4.1.4. EVALUACIÓN DE UN GRUPO DE MUESTRAS

De las 106 muestras de suero sanguíneo evaluadas, 7 fueron positivas para el serotipo DENV-2 por el método PCR en tiempo real (qPCR) estandarizado. En la evaluación de las mismas muestras con los sets de cebadores LAMP diseñados en el presente proyecto de investigación, se obtuvo las 7 muestras positivas con el set de cebadores LAMP para DENV-2 (detectadas por qPCR) y las demás muestras negativas (Anexo 15).

Las 7 muestras positivas tanto para PCR en tiempo real como para el set de cebadores LAMP de DENV-2, fueron enviadas a *Macrogen Korea* para su respectivo secuenciamiento. Los resultados mostraron que las 7 muestras pertenecían al serotipo 2 del virus dengue y según el análisis en *BLAST*, fueron secuencias similares a las aisladas en el Perú para el serotipo 2 con un 99% de identidad según la base de datos de GeneBank.

4.2. DISCUSIÓN

Los virus ARN se replican con una elevada tasa de error, debido a la ausencia de actividad correctora de errores de su ARN polimerasa, confiriéndoles adaptación a los cambios en las presiones selectivas. Además, se ha comprobado la recombinación entre cepas de DENV, debido a la circulación simultánea de genotipos diferentes de un serotipo en un mismo hospedero. Por estas razones el virus dengue exhibe un alto grado de variabilidad genética (Fajardo Rossi, 2011; Ramos-Castañeda, Barreto dos Santos, Martínez-Vega, Galvão de Araujo, Joint & Sarti., 2017). Debido a la alta tasa de mutación viral es importante la búsqueda de nuevos blancos de amplificación (*targets*) que ofrezcan alternativas en el diagnóstico, empleando técnicas moleculares como lo es la Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP por sus siglas en inglés) en caso nos encontremos en escenarios de variación de cierta región determinada como *target* de alguno de los serotipos del virus dengue para esta técnica.

La elección del *target* es el primer paso para la obtención de un sistema diagnóstico específico y eficiente. En trabajos previos sobre sistemas LAMP, se ha encontrado el empleo de las mismas regiones para la detección de los cuatro serotipos del virus dengue como son la proteína C-prM, la proteína no estructural 1 (NS1) y la región 3' no traducida (3'UTR por sus siglas en inglés); sin embargo, en la actualidad se sabe que el uso del mismo gen no es la mejor elección debido a la relación que podría encontrarse entre los cuatro serotipos para ese *target* (Hu et al.; 2015; Lau et al.; 2015). Se realizó entonces en la medida de lo posible la búsqueda de *targets* diferentes para los cuatro serotipos del virus dengue que mostraran en los alineamientos de las secuencias ser regiones conservadas para el serotipo respectivo, pero variable con respecto a los otros tres serotipos restantes, lo cual dotaría de especificidad a los cebadores seleccionados. Se determinó luego del alineamiento de secuencias como *target* la proteína no estructural 5 (NS5) de la poliproteína para los cebadores de DENV-1 y DENV-3, siendo esta región considerada la más conservada y

multifuncional con actividad ARN polimerasa ARN dependiente importante en el proceso de replicación viral (Velandia & Castellanos, 2011; Yábar V, 2003), la proteína no estructural 3 (NS3) como *target* para los cebadores de DENV-2, región de la poliproteína con un rol importante durante la síntesis del ARN viral junto con la proteína NS5 y que además sugiere participación en los procesos de ensamblaje y transporte intracelular del flavivirus (Velandia & Castellanos, 2011; Yábar V, 2003) y finalmente la región 3' no traducida (3'UTR) para los cebadores de DENV-4, región terminal también importante en los procesos de replicación del ARN por contener motivos complementarios que favorecen el estado cíclico del genoma viral (Yábar V, 2003). Los cuatro blancos de amplificación seleccionados mostraron ser altamente conservados para sus serotipos respectivos según el análisis del alineamiento en el programa bioinformático MEGA 7. Por ende, el proyecto de investigación reporta los primeros *targets* en el país, diferentes a los reportados en *papers* sobre LAMP para la diferenciación de los serotipos del virus dengue.

Los principales elementos de la reacción LAMP incluyen al *target*, buffer de reacción, *Bst* polimerasa y el set de cebadores (4 a 6 cebadores) que determinan la especificidad de la amplificación. Por ende, el diseño de los cebadores es el componente más sensible que determina el éxito (la eficiencia y precisión) de la reacción (Megido, 2016). Los cebadores ideales deben carecer de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre sí. La complementariedad en el extremo 3' induce a que ambos cebadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y de iniciadores a la vez, formando los denominados heterodímeros, productos cortos que amplifican eficientemente reduciendo la cantidad de cebadores disponibles en la reacción y provocando un menor rendimiento del amplicón de interés (Sánchez & Saldaña, 2004). Por ello en el análisis *in-silico* de los sets de cebadores para cada serotipo del virus dengue se incluyó la determinación de especificidad y probabilidad de formación de estructuras secundarias (homodímeros y heterodímeros) de cebadores empleando el análisis de los valores

del delta de G (energía libre de Gibbs) obtenido del programa bioinformático *OligoAnalyzer 3.1*. El delta de G representa el grado en que una reacción es favorable (probabilidad de ocurrencia de la reacción), donde un delta de $G < 0$ significa que los reactivos deberían eventualmente convertirse en los productos («Bioquímica/Termodinámica», 2006). Por tanto, si lo ideal en una reacción LAMP es tener la menor probabilidad de formación de estructuras secundarias, entonces se necesita que el delta de G sea lo más cercano posible a un valor positivo. En su defecto, para cada set de cebadores se estableció un valor máximo de delta de G permitido igual a -9Kcal/mol, considerando que los valores que tendieran a ser más positivos que el establecido significarían probables mejores sets de cebadores candidatos.

Ciertas sustancias tienen la propiedad de experimentar cambios de color para valores bastante definidos del pH, llamándoselas “indicadores” (Howard, 1956). Debido a la subjetividad que supone la visualización directa del precipitado de pirofosfato de magnesio en la reacción LAMP, así como el empleo de intercalantes fluorescentes los cuales además dependen del uso de una cámara UV (Sánchez et al.; 2014); se propone en contraposición colorantes sensibles al pH para la obtención del cambio de color en una reacción LAMP, basándose únicamente en la propiedad que tiene el ADN polimerasa de liberar un ion hidrógeno en el momento que incorpora un desoxinucleósido trifosfato en el ADN naciente (Tanner et al.; 2015). Luego del análisis bibliográfico en el cual se propone un conjunto de colorantes sensibles al pH con resultados favorables y otros menos favorables, se tomó como referencia el colorante rojo neutro y verde de malaquita. En el ensayo realizado previamente, se obtuvo que el colorante verde de malaquita necesitaba un rango de pH con medidas extremas para su viraje de color, mientras el colorante rojo neutro exhibía un rango de pH adecuado para la visualización del cambio de color (de 8U a 6U de pH) y un viraje con colores claramente discernibles, determinando un pH básico el color amarillo-naranja (reacción negativa) y un pH ácido el color fucsia-rosado (reacción positiva). Es

importante destacar que dentro de la preparación del colorante el filtrado debe ser imprescindiblemente realizado para evitar la presencia de impurezas en la reacción LAMP que dificulten la buena visualización del cambio de color; además, la sensibilidad de este colorante ante la mínima presencia de dímeros de cebadores puede ocasionar el viraje generando un falso positivo debido a la falta de cronometraje y temperatura constante de la reacción (Rosales, 2018).

Para el emprendimiento de la evaluación analítica del sistema molecular cualitativo se tomó como referencia la “Guía para validación de métodos cualitativos de PCR en tiempo real” (Broeders, Huber, Grohmann, Berben, Taverniers, Mazzara, Roosens & Morisset, 2014), en la cual se especifica la medida de la sensibilidad analítica empleando los denominados LOD_6 y $LOD_{95\%}$ para la determinación de resultados con el 95% de confianza, metodología que se siguió de la misma forma detallada en la guía. Se obtuvo entonces en este trabajo de investigación una sensibilidad analítica de 664.99 copias/ μ L para los cebadores de DENV-1, 3035.75 copias/ μ L para DENV-2, 118921.88 copias/ μ L para DENV-3 y 207.65 copias/ μ L para los cebadores de DENV-4. En trabajos previos sobre LAMP para la diferenciación de los serotipos del virus dengue, se reportan sensibilidades analíticas que están en el rango de 10 a 100 copias del *target*, con una mayor probabilidad de ocurrencia de la reacción a partir de 100 o >100 copias del *target* (Hu et al.; 2015; Lau et al.; 2015; Teoh et al.; 2013); sin embargo se debe resaltar que algunos de éstos estudios similares, presentan falta de información sobre el nivel de confianza de sus hallazgos de sensibilidad analítica; por lo que debe mencionarse que los sets de cebadores propuestos en esta investigación llegan a detectar hasta el orden de 10^2 copias/ μ L para los sets de cebadores de DENV-1, 2 y 4 y hasta 10^3 copias/ μ L para los cebadores de DENV-3 pero con una reproducibilidad reducida. Además, en la búsqueda de nuevos *targets* para diferenciar los serotipos del virus dengue mediante el empleo de la técnica LAMP se han reportado en el 2018 valores del 100% de reproducibilidad a partir de 10^2 (DENV-1) y 10^3 moléculas de ARN (DENV-

2, DENV-3 y DENV-4) con el 95% de confianza (Lopez-Jimena, Bekaert, Bakheit, Frischmann, Patel, Simon-Loriere, Lambrechts, Duong, Dussart, Harold, Fall, Faye, Sall & Weidmann, 2018); resultados que demuestran que los valores de sensibilidad analítica son superiores cuando se trabaja en base a un nivel de confianza del 95% a más, tal como sucede con valores determinados en la presente investigación que pueden ser superiores a los encontrados en trabajos previos. En cuanto a la carga viral que se puede encontrar comúnmente en una persona infectada por el virus dengue, factor a considerar en base a la sensibilidad analítica que se tiene, es poca la información que puede encontrarse, debido a que no es una enfermedad en la que deba monitorearse estos niveles virales como sí sucede con virus del VIH. Sin embargo, se sabe que la replicación viral se da rápidamente llegando una persona infectada a alcanzar niveles virales muy altos en pocos días. Se ha encontrado cargas virales consideradas mínimas de 4620 copias, siendo el rango de 1,900,000 copias a 3,440,000 copias presentadas en su mayoría, en pacientes diagnosticados con “fiebre de dengue” entre el tercer y cuarto día; mientras que, aquellos pacientes diagnosticados con “fiebre de dengue hemorrágica” pueden llegar hasta los 14,900,000 copias en el tercer día de la enfermedad (Wang, Chao, Kao, Wu, Liu, Li, Lin, Ho, Huang & King, 2003). Por lo cual, es importante destacar que, si bien se debe buscar la menor sensibilidad posible, también se debe tener como referencia las viremias encontradas comúnmente, así entonces, los cebadores aquí propuestos podrían fácilmente detectar el dengue en la mayoría de las personas infectadas con estos títulos virales.

Llevar a cabo previamente un análisis *in-silico* con herramientas bioinformáticas que permitan asegurar de manera previa la amplificación sólo del *target* de interés, así como la prueba experimental empleando “*no targets*” estrechamente relacionados al blanco para verificar la existencia o no de reacción cruzada (cross-reactividad), son los dos pasos establecidos para una exitosa evaluación de la especificidad analítica (Broeders et al.; 2014). Los cebadores

seleccionados en esta investigación fueron específicos a su serotipo respectivo según el programa *primer blast*, además se tomó como referencia la evaluación de la cross-reactividad dentro de los cuatro serotipos del virus dengue, así como con zika y chikungunya (Hu et al.; 2015; Lau et al.; 2015; Lopez-Jimena et al.; 2018; Teoh et al.; 2013), ambos arbovirus estrechamente relacionados a las regiones geográficas donde suelen desencadenarse casos de dengue y con sintomatología febril muy similar. Los resultados obtenidos mostraron una especificidad del 100% debido a que todas las réplicas evaluadas por duplicado presentaron viraje de color (fucsia), mientras que en los “*no targets*” no se observó ningún viraje (amarillo). Éstos resultados son similares con los exhibidos por ensayos LAMP de diferenciación en investigaciones previas, las cuales también carecen de cross-reactividad frente a otros *targets* como son el virus de encefalitis japonesa, virus del oeste del Nilo, virus del zika y chikungunya (Hu et al.; 2015; Lau et al.; 2015; Lopez-Jimena et al.; 2018; Teoh et al.; 2013) , pero con menor confianza al testear solo dos réplicas por duplicado (Lau et al.; 2015). En contraste con las ventajas que supone la técnica LAMP como son la rapidez con la que se puede obtener un resultado positivo o negativo (aproximadamente 1 hora \pm 5 min) y la simplicidad de la operatividad, en comparación con el aún considerado *gold standard*, el aislamiento viral; los cebadores aquí propuestos son una alternativa prometedora para su futura evaluación como método de detección en laboratorios que no tienen la suficiente implementación para realizar técnicas de detección más complejas como es el PCR en tiempo real.

Diversas acciones de prevención y control en regiones del país donde se registran brotes de dengue anuales («Ministerio de Salud del Perú - MINSA», 2018.), causaron que, en el 2018 el número de casos descendiera. Este factor limitó la labor de ubicación de zonas afectadas. Por lo que, los cebadores diseñados en la presente investigación no pudieron ser testeados en un óptimo número de muestras que pudieran reflejar una idea preliminar de los valores predictivos positivo

y negativo. Sin embargo, como ensayo adicional a los objetivos planteados, se evaluó un pequeño grupo de muestras de personas febriles provenientes de dos regiones afectadas por el virus dengue como son Iquitos y Piura. La importancia de este ensayo fue probar principalmente que el LAMP diseñado funcionaba de manera específica en muestras problema y que además sea óptimo empleando ARN directamente extraído de la muestra, sin necesidad de emplear ningún proceso adicional como es la transcripción reversa. Dentro de las 106 muestras evaluadas con los cebadores LAMP, obtuvimos 7 muestras positivas al serotipo de DENV-2 (cambio de color a fucsia) y no a los otros tres serotipos restantes; mientras que las demás muestras no presentaron viraje de color en ninguno de los sets de cebadores LAMP. Adicionalmente, se realizó el diagnóstico de las mismas muestras empleando PCR en tiempo real, dando como positivas a las mismas 7 muestras testeadas por LAMP, con la desventaja de que para el PCR en tiempo real se empleó ADNc, siendo necesaria luego de la extracción del ARN del suero realizar el proceso de transcripción reversa. Dichas muestras diagnosticadas como positivas para ambos métodos fueron enviadas a secuenciar, obteniendo que efectivamente pertenecían a DENV-2 principalmente a cepas aisladas en Perú con el 99% de identidad según la base de datos de GeneBank. Claramente el número de muestras positivas halladas en este ensayo fue insuficiente para poder calcular valores predictivos, además se necesitaría muestras positivas a los demás serotipos para la evaluación completa de los sets diseñados; sin embargo, es muy importante destacar el haber obtenido el mismo resultado que la técnica de PCR en tiempo real, empleando un método más sencillo y definitivamente más económico. Lo atractivo del LAMP para diferenciar los serotipos del virus dengue, es que, es una alternativa de detección en campo y permite, por sobre las pruebas ya empleadas en estos entornos como los RDTs y ELISAS, el detectar a personas infectadas en la etapa temprana de la enfermedad; punto importante debido a que, en dengue, una persona infectada podría significar diez personas infectadas en un periodo corto de tiempo. Todo trabajo de investigación presenta limitaciones en su desarrollo, la base del

conocimiento se fundamenta en descubrir una pieza a la vez, y las limitaciones nos muestran dónde hay que hacer mayores esfuerzos en la siguiente ocasión, proponiendo oportunidades para investigaciones futuras (Martínez, 2017).

CONCLUSIONES

Se diseñaron, evaluaron y seleccionaron *in-silico* sets de cebadores LAMP *in-house* para la detección de los cuatro serotipos del virus dengue.

Se obtuvieron los plásmidos recombinantes con los *targets* de amplificación para la detección de cada serotipo del virus dengue y con ello, se optimizó las condiciones de amplificación de los cebadores LAMP *in-house* seleccionados.

El límite de detección de los sets de cebadores LAMP *in-house* para DENV-1 fue 664.99 copias/ μ L, para DENV-2 fue 3035.75 copias/ μ L, para DENV-3 fue 196476.8 copias/ μ L y para DENV-4 fue 207.65 copias/ μ L.

La especificidad analítica de los cuatro sets de cebadores LAMP fue del 100% dentro de los cuatro serotipos del virus, en contra de dos arbovirus estrechamente relacionados y frente a blancos de amplificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, C., & Gómez, I. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue.
- Asociación de Microbiología y Salud. (2016). Recuperado 18 de agosto de 2018, de <http://www.microbiologiaysalud.org/noticias/dengue/>
- Bioquímica/Termodinámica. (2006). Recuperado 4 de noviembre de 2018, de https://es.wikibooks.org/wiki/Bioqu%C3%ADmica/Termodin%C3%A1mica?fbclid=IwAR05DxULP3sMc3XMomDUtON1IZ9bkn7yTbnxSO_tATRg7Xdzcg6lcFWR5y4
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Roosens, N. & Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>
- Cabezas, C., Fiestas, V., García-Mendoza, M., Palomino, M., Mamani, E., & Donaires, F. (2015). Dengue en el Perú: a un cuarto de siglo de su reemergencia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(1), 146-156. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342015000100021&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Cabezas S, C. (2005). Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22(3), 212-228. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342005000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Celaya, Y. (2016). Posible inhibición del complejo NS3-NS2B del virus de dengue por péptidos *in silico*. Recuperado de <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/18817>
- Centers for Disease Control and Prevención CDC. (2014). Recuperado 18 de agosto de 2018, de <https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>

- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. (2017). Recuperado 18 de agosto de 2018, de http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=154
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. (2018). Recuperado 8 de noviembre de 2018, de http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=347
- Gozzer, E., Vergara, L., & Hajar, G. (2016). Versión extendida de la Guía de práctica clínica de dengue: documento basado en evidencias, 270.
- Eiken GENOME SITE. (2005). Recuperado 18 de agosto de 2018, de <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>
- Evia, J. R. B. (2013). Dengue. Problema que preocupa y ocupa a la salud pública, 18.
- Fajardo Rossi, A. (2011). Variabilidad genética del virus Dengue en la región sudamericana :primeros abordajes epidemiológicos frente a una eventual re-emergencia del virus Dengue en el Uruguay. Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/123456789/4134>
- Felix, A. C., Romano, C. M., Centrone, C. de C., Rodrigues, C. L., Villas-Boas, L., Araújo, E. S., ... Levi, J. E. (2012). Low Sensitivity of NS1 Protein Tests Evidenced during a Dengue Type 2 Virus Outbreak in Santos, Brazil, in 2010. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 19(12), 1972-1976. <https://doi.org/10.1128/CVI.00535-12>
- Ghosh, R., Nagavardhini, A., Sengupta, A., & Sharma, M. (2015). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* - wilt pathogen of chickpea. *BMC Research Notes*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-0997-z>
- Hamid, P. H., Widyasari, A., Purwati, & Krediastuti, A. N. (2015). Application of combined multiplex-PCR and RT-LAMP to detect Dengue Fever, from clinically infected patients in

- Surabaya, Indonesia. *International Research Journal of Microbiology*, 6(1), 1-5. Recuperado de <https://www.interesjournals.org/abstract/application-of-combined-multiplexpcr-and-rtlamp-to-detect-dengue-fever-from-clinically-infected-patients-in-surabaya-ind-2191.html>
- Howard. (1956). *Introduccion a la Quimica*. Reverte.
- Hu, S., Li, M., Zhong, L., Lu, S., Liu, Z., Pu, J., Wen, J. & Huang, X. (2015). Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4. *BMC Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0595-1>
- Kelley, W. N. (1993). *Medicina interna*. Ed. Médica Panamericana.
- Lau, Y.-L., Lai, M.-Y., Teoh, B.-T., Abd-Jamil, J., Johari, J., Sam, S.-S., Tan, K.-K & AbuBakar, S. (2015). Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PloS One*, 10(9), e0138694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138694>
- Lázaro, E. (2008). *Virus emergentes*. Equipo Sirius.
- Lopez-Jimena, B., Bekaert, M., Bakheit, M., Frischmann, S., Patel, P., Simon-Loriere, E., Lambrechts, L., Duong, V., Dussart, P., Harold, G., Fall, C., Faye, O., Sall, A. & Weidmann, M. (2018). Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each dengue virus serotype. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(5), e0006381. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006381>
- Maguiña Vargas, C., Osoreo Plengue, F., Suárez Ognio, L., Soto Arquíñigo, L., & Pardo Ruiz, K. (2005). Dengue clásico y hemorrágico: una enfermedad reemergente y emergente en el Perú. *Revista Médica Herediana*, 16(2), 120-140. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1018-130X2005000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Martínez, R. A. (2017, abril 7). Principales tipos de limitaciones. Recuperado 7 de noviembre de 2018, de <https://comunicarautores.com/2017/04/07/importancia-de-expresar-las-limitaciones-del-estudio-2-principales-tipos-de-limitaciones/>
- Megido. (2016). Diseño y puesta a punto de un método LAMP para el diagnóstico de enfermedades producidas por Cestodos, 36.
- Mostorino, R., Rosas, A., Gutierrez, V., Anaya, E., Cobos, M., & García, M. (2002). Manifestaciones clínicas y distribución geográfica de los serotipos del dengue en el Perú-Año 2001. Recuperado 18 de agosto de 2018, de http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/Medicina_Experimental/v19_n4/manifes.htm
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102748/>
- OMS | Dengue. (2018). Recuperado 18 de agosto de 2018, de <http://www.who.int/topics/dengue/es/>
- OPS OMS | Dengue. (2018). Recuperado 18 de agosto de 2018, de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734&lang=es
- Organization, W. H. (2009). Dengue guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control: nueva edición. Recuperado de <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44504>
- Pantoja, E. (2014). *Sensibilidad de las pruebas serológicas para la detección temprana del dengue*. Universidad Veracruzana, México. Recuperado de <https://www.uv.mx/blogs/favem2014/files/2014/06/Tesis-Ivan.pdf>
- Parida, M., Horioka, K., Ishida, H., Dash, P. K., Saxena, P., Jana, A. M., Islam, M., Inoue, S., Hosaka, N., & Morita, K. (2005). Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Journal*

- of Clinical Microbiology*, 43(6), 2895-2903. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2895-2903.2005>
- Pavlicich, V. (2016). Dengue: revisión y experiencia en pediatría. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 87(2), 143-156. Recuperado de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1688-12492016000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Pongsiri, P., Praianantathavorn, K., Theamboonlers, A., Payungporn, S., & Poovorawan, Y. (2012). Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(5), 342-346. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60055-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60055-8)
- Pupo, M., Amín, N., Álvarez, M., Morier, L., Rodríguez, H., González, Z., & Guzmán, M. G. (2004). Amplificación dependiente de anticuerpos del virus dengue en cepas cubanas utilizando anticuerpos monoclonales. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(3), 197-202. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602004000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ramos-Castañeda, J., Barreto dos Santos, F., Martínez-Vega, R., Galvão de Araujo, J. M., Joint, G., & Sarti, E. (2017). Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005224>
- Resolución Ministerial N° 087-2011 - MINSA. (2011). Recuperado 18 de agosto de 2018, de http://www.minsa.gob.pe/portada/esnemo_normatividad.asp#
- Rosales, A. L. (2018). *Diseño de una técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) in-house para la detección de Plasmodium falciparum y Plasmodium vivax*. Universidad Nacional de Piura, Perú.

- Sánchez, E., Nina, M., Aguirre, P., Arce, M., Toro, N., & Vilela, R. (2014). Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Revista CON-CIENCIA*, 127. Recuperado de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=&lng=es&nrm=iso&tlng=
- Sánchez, I. P. R., & Saldaña, H. A. B. (2004). La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención., (3), 13.
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59-68. <https://doi.org/10.2144/000114253>
- Teoh, B.-T., Sam, S.-S., Tan, K.-K., Johari, J., Danlami, M. B., Hooi, P.-S., Md-Esa, R. & AbuBakar, S. (2013). Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 387. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-387>
- Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33-43. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70074-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1)
- Velarde, D. C. N. (2005). Instituto Nacional de Salud, 49.
- Wang, W.-K., Chao, D.-Y., Kao, C.-L., Wu, H.-C., Liu, Y.-C., Li, C.-M., Lin, S.-C., Ho, S.-T., Huang, J.-H. & King, C.-C. (2003). High Levels of Plasma Dengue Viral Load during Defervescence in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever: Implications for Pathogenesis. *Virology*, 305(2), 330-338. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1704>
- Yábar V, C. (2003). Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del ARN. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 20(1), 51-57. Recuperado de

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342003000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhang, H., Li, W., Wang, J., Peng, H., Che, X., Chen, X., & Zhou, Y. (2014). NS1-based tests supplying a diagnostic utility for confirming dengue infection: a meta-analysis. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 0, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.02.002>

ANEXOS

Anexo 1: Características en el diseño de cebadores LAMP.

Disponible en: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>

Primer Explorer V5 es un software especialmente diseñado para la generación de cebadores LAMP. Esta herramienta bioinformática toma en consideración los siguientes puntos principales del diseño del cebador:

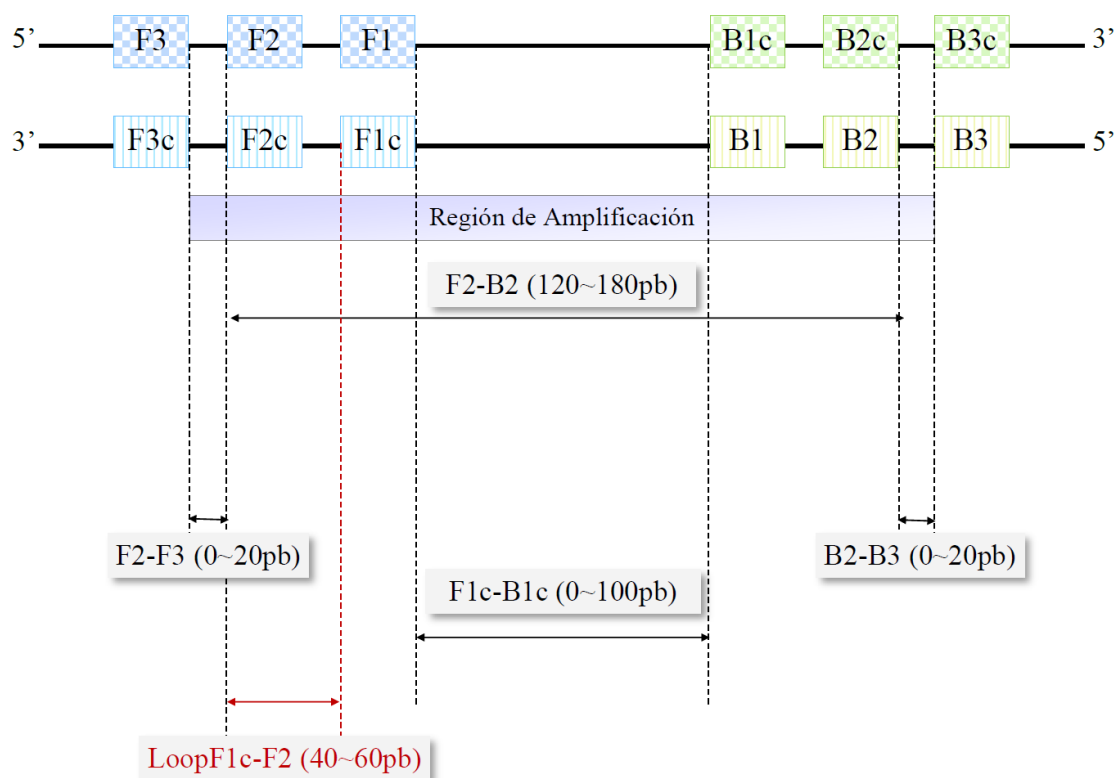


Figura 11. Distancias recomendadas entre los cuatro cebadores LAMP. Estas distancias deben ser tomadas en cuenta al momento del diseño de los cebadores para su óptimo funcionamiento. (Modificado de «[Eiken GENOME SITE] - El principio del método LAMP», s. f.)

I. Distancia entre regiones del cebador

- La distancia entre el extremo 5' de F2 y B2 se considera de 120 a 180 pb, y la distancia entre F2 y F3, así como B2 y B3 es de 0 a 20 pb.
- La distancia para las regiones de formación de bucle (5' de F2 a 3' de F1, 5' de B2 a 3' de B1) es de 40 a 60 pb.

II. Valor de Tm para regiones del cebador

Las secuencias F2 y B2 tienen un valor que va dentro del rango de 60-65°C, temperatura óptima de la enzima Bst polimerasa. El valor de Tm de F1c y B1c es ligeramente más alta que el par anterior, para favorecer la formación inmediata de la estructura de horquilla luego del desplazamiento de la hebra simple de ADN del molde. El valor de Tm de los cebadores externos (F3 y B3) es menor que F2 y B2 para asegurar que ocurra primero la hibridación y síntesis de los cebadores internos que la de los externos.

III. La estabilidad del extremo del cebador

El dG calculado en las 6 pb finales de las siguientes regiones debe ser menor que -4 kcal/mol, extremo 5' de F1c/B1c y extremo 3' de F2/B2 así como F3/B3.

IV. Contenido de GC

Aproximadamente 50 a 60 % en el caso de ser rico en GC y aproximadamente 40 a 50% para aquellos ricos en AT.

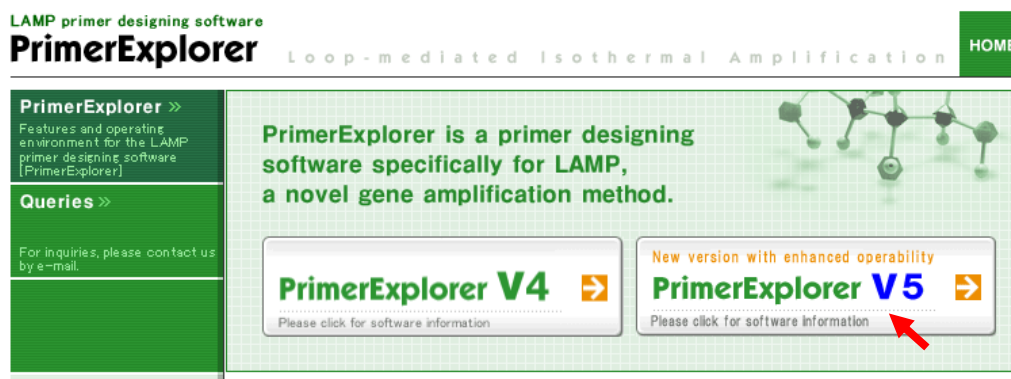
V. Estructura secundaria

Los cebadores deben diseñarse de manera que no formen fácilmente estructuras secundarias. La secuencia del extremo 3' no debe ser rica en AT o complementaria a otros cebadores

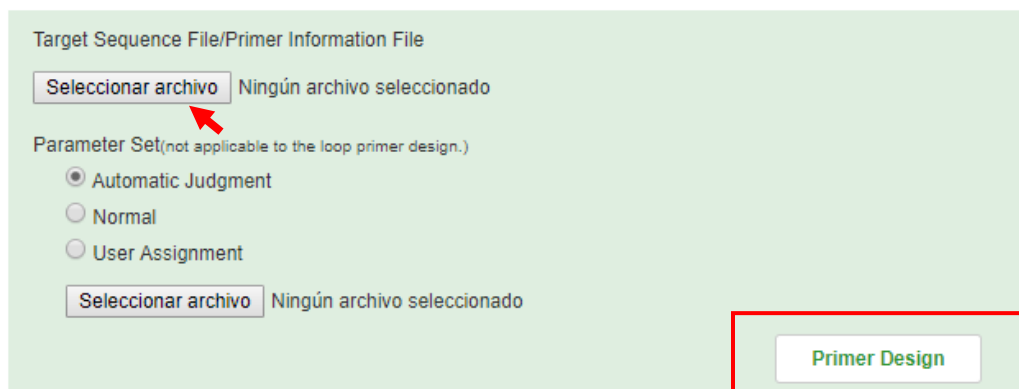
Anexo 2: Generación de cebadores LAMP candidatos.

Programa bioinformático: *PrimerExplorer V5*

1. Colocar en un bloc de notas la secuencia *target* de la cual se desea obtener los candidatos a cebadores LAMP.
2. Ingresar al link de la página *online*: <https://primerexplorer.jp/e/>
3. Hacer *click* en la opción *PrimerExplorer V5*.



4. Subir el *file* del bloc de notas con la secuencia *target* en la opción “Seleccionar archivo”, presionar la opción “Automatic Judgment” y hacer click en “Primer design”.



5. Automáticamente aparecerá la secuencia *target* cargada. Hacer *click* en la opción “generar”, y aparecerá el número de sets que se generaron como candidatos.

CARGAR ARCHIVO: v5.txt

1 AGTTGTTAGT CTACGTGGAC CGACAGAGAC AGTTTCGAAAT CGGAAGCTTG CTTAACGTAG TTCTAACAST TTTTGTITAG 80
81 AGAGCAGATC TTGATGAAC AACCAACGGA AAAAGACGGC TCGACCGTCT TTCAATATGC TGAACCGGCG GAGAAACGCG 160
161 GTTCTCACTG TTTCACAGTT GGCGAAGAGA TTCTCAAAAG GATTGCTCTC AGGCCAAGGA CCGATGAAC TGGTATGCGC 240
241 TTTCATAGCA TTCTAAGAT TTCTAGCCAT ACCCCCAACA GCAGGAATTT TGGTAGATG GGGCTCATTG AAGAAGAATG 320
321 GAGCAATCAA AGTGTACGGG GGTTCACAGA AAGAAATCTC AAACATGTTG AATATAATGA ATAGAAGGAA AAGATCTGTG 400
401 ACCATGCTCC TTATGCTGGT GCTTACAGCC TTGGCGTTCC ATTTGACTAC ACGAGGGGGA GAGCGGCACA TGATAGTCAG 480
481 CAAGCAGGAA AGAGGAAAGT CACTTTTGT TTAGACCTCA GCAGGTGTCA ACATGTGCAC CCTTATAGCG ATGGATTGG 560
561 GAGAGTTATG TGAGGACACA ATGACTTACA AATGCCCTCG AATCACTGAG GCGGAACCGG ATGACGTTGA TTGTGGTGC 640
641 AATGCTACAG ACACATGGGT GACCTATGGA ACATGTTCCC AAACCTGGGA GCACCGAAGA GACAAACGTT CGGTGCGACT 720
721 AGCCCCACAC GTGGGACTTG GTTTGGAAC AAGAACCGAA ACGTGGATGT CCTCCGAAGG CGTTTGAAA CAGATACAAA 800
801 GAGTGGAGAC TTGGGCCCCG AGACACCCAG GATTACCGGT GATAGCCCTC TTCTAGCAC ATGCCATAGG AACATCCATC 880

Establecer la mutación
Mut / Contrás
Claro

Imprimación fija
F3
F2
F1
B1
B2
B3
Claro

Guardar objetivo

Opción de diseño
☒ Defecto
☐ Común
☐ Específico

Number of Primer Candidates: F1=169, F2=214, F3=546, B1=162, B2=208, B3=532, FIP=189, BIP=184
3 Primer set(s) were generated.

1. Generar

Generar

3

Se generaron conjuntos.

6. Hacer *click* en la opción “Mostrar” y aparecerá en una nueva ventana la lista de los cebadores LAMP candidatos y su ubicación en la secuencia *target* para su respectiva evaluación posterior.

PrimerExplorer V5

Software

1. Turn on the check box to make an order.
2. Push "Confirm" button in order to transfer to page "Order".
3. Push "Save List" button to download Excel format file.

Confirm

Save List

DesignId 190108085043

Primer set: sorting rule [Easy]

Target DNA	ATGACTTACA	AATGCCCTCG	AATCACTGAG	GCGGAACCGG	ATGACGTTGA	TTGTTGGTGC	AATGCTACAG	ACACATGGGT	GACCTATGGA	ACAATGTTCC	AAACTGGCGA
(Complement)	tactgaatgt	ttaacgggagc	ttagtgactc	cgcccttggtc	tactgcaact	aacaacccag	ttacgatgtc	tgtgtaccca	ctggatacct	tgtacaaggg	tttgaccgct
CONSENSUS(*)	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Primer IDdG(dimer)	581	591	601	611	621	631	641	651	661	671	681
<input type="checkbox"/> [2]	-1.66										
<input type="checkbox"/> [1]	-2.46										
<input type="checkbox"/> [4]	-2.13										
		TGCCCTCG	AATCACTGAG	GCGGAACCGG	ATGACGTTGA	TTGTTGGTGC	TACAG	ACACATGGGT	GACCT	ccttgtacaaggg	tttgaccgct

[outputs: 3 sets] Displayed 1 - 3 .

DesignId 190108085043

Anexo 3: Análisis *in silico* de estructuras secundarias para los cebadores LAMP

Programa bioinformático: *OligoAnalyzer 3.1*

1. Ingresar al link de la página *online*: <https://www.idtdna.com/calc/analyser>
2. En la ventana “*Sequence*” colocar el cebador a evaluar (en este programa los cebadores son evaluados individualmente). En el apartado “*Parameter sets*” dejar los parámetros indicados por defecto o modificar las concentraciones de los componentes según se desee. Hacer *click* en “*ANALYZE*”.

OligoAnalyzer

Instructions | Definitions | Feedback

Sequence: 5' MOD INTERNAL 3' MOD MIXED BASES

GATGAACCTTGTGGGTAGGGCTAGA

Bases 24 CLEAR SEQUENCE

Try the new batch mode here

Parameter sets

SpecSheet (Default)

Target type: DNA

Oligo Conc: 0.25 µM

Na⁺ Conc: 50 mM

Mg⁺⁺ Conc: 0 mM

dNTPs Conc: 0 mM

ANALYZE

HAIRPIN

SELF-DIMER

HETERO-DIMER

NCBI BLAST

TM MISMATCH

ADD TO ORDER

3. Aparecerá una ventana con las características del cebador. Hacer click en “SELF-DIMER”.

Results

RESUSPENSION DILUTION

SEQUENCE	5'- GAT GAA CTT GTG GGT AGG GCT AGA -3'
COMPLEMENT	5'- TCT AGC CCT ACC CAC AAG TTC ATC -3'
LENGTH	24
GC CONTENT	50 %
MELT TEMP	58.1 °C
MOLECULAR WEIGHT	7512.9 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	244500 L/(mole·cm)
nmole/OD ₂₆₀	4.09
µg/OD ₂₆₀	30.73

ANALYZE

HAIRPIN

SELF-DIMER

HETERO-DIMER

NCBI BLAST

TM MISMATCH

ADD TO ORDER

4. Aparecerán de mayor a menor los posibles Homodímeros que pueden formarse empleando dicho cebador. Asegurarse que no sobrepase el valor de ΔG establecido (-9Kcal/mol). En caso esto suceda, considerar cambiar o mejorar el cebador por considerarse probable la formación de esta estructura secundaria.

Homo-Dimer Analysis

The delta G is calculated by taking into account the longest stretch of complementary bases. These pairs of complementary bases are represented by a solid line. Dotted lines represent additional complementary bases for that dimer structure, but their presence does not impact calculated delta G values. Actual delta G values may vary based on presence of additional complementary bases. The Maximum Delta G value refers to the free energy of the oligo sequence binding to its perfect complement.

Dimer Sequence:

5'- GATGAACCTGTGGGTAGGGCTAGA -3'
Maximum Delta G: -43.71 kcal/mole

Delta G: -4.16 kcal/mole Base Pairs: 4

5' GATGAACCTGTGGGTAGGGCTAGA
||||
3' AGATCGGGATGGGTGTTCAAGTAG

ANALYZE
HAIRPIN
SELF-DIMER
HETERO-DIMER
NCBI BLAST
TM MISMATCH
ADD TO ORDER

5. Hacer click en “HETERO-DIMER” y en la ventana “Secondary Sequence” introducir el cebador reverse y presionar “CALCULATE”.

dNTPs Conc 0

Hetero-Dimer Analysis

Primary Sequence:

5' GAT GAA CTT GTG GGT AGG GCT AGA -3'

Secondary Sequence:

5' TGGGTTTGTCTCCATC -3'

CREATE COMPLEMENT CALCULATE

ANALYZE
HAIRPIN
SELF-DIMER
HETERO-DIMER
NCBI BLAST
TM MISMATCH
ADD TO ORDER

6. Aparecerán de mayor a menor los posibles Heterodímeros que pueden formarse empleando dichos cebadores. Asegurarse que no sobrepase el valor de ΔG establecido (-9Kcal/mol). En caso esto suceda, considerar cambiar los cebadores por considerarse probable la formación de esta estructura secundaria.

Hetero-Dimer Analysis

The delta G is calculated by taking into account the longest stretch of complementary bases. These pairs of complementary bases are represented by a solid line. Dotted lines represent additional complementary bases for that dimer structure, but their presence does not impact calculated delta G values. Actual delta G values may vary based on presence of additional complementary bases. The Maximum Delta G value refers to the free energy of the oligo sequence binding to its perfect complement.

Primary Sequence: 5'- GATGAACCTGTGGGTAGGGCTAGA -3'

Secondary Sequence: 5'- TGGGTTTGTCTCCATC -3'

Maximum Delta G: -43.71 kcal/mole

Delta G: -5.02 kcal/mole Base Pairs: 3

5' GATGAACCTGTGGGTAGGGCTAGA
|||
3' CTACCTCCTGTTTGGGT

ANALYZE
HAIRPIN
SELF-DIMER
HETERO-DIMER
NCBI BLAST
TM MISMATCH
ADD TO ORDER

Anexo 4: Análisis *in-silico* de especificidad para los cebadores LAMP

Programa bioinformático: *Primer-BLAST*

1. Ingresar al link de la página online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
2. En el apartado “*Primer Parameters*”, colocar los cebadores a evaluar tanto *forward* y *reverse* en sentido 5'→3'.

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Reset page Save search parameters Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) Clear

Range

Forward primer From To Clear

Reverse primer

Or, upload FASTA file

Seleccionar archivo Ningún archivo seleccionado

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) GATGAACCTTGTTGGGTAGGGCTAGA Clear

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) TGGGTTTTGTCCTCCATC Clear

PCR product size Min 70 Max 1000

of primers to return 10

Primer melting temperatures (T_m) Min 57.0 Opt 60.0 Max 63.0 Max T_m difference 3

Exon/intron selection

3. En el apartado “*Primer Pair Specificity Checking Parameters*” dirigirse hacia la opción “*Database*” y elegir la opción “nr”.

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check ☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode Automatic

Database nr

Exclusion Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency

Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end.

Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Max target size 4000

Allow splice variants ☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers

Show results in a new window Use new graphic view

4. En la opción “*Organism*”, borrar la búsqueda por defecto *Homo sapiens* y colocar el organismo específico al que se busca los cebadores hagan *match*. En caso se quiera

buscar las secuencias que hagan *match* con los cebadores en su totalidad, no colocar el nombre de ningún organismo.

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Specificity check ☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode Automatic

Database nr

Exclusion ☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) ☐ Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism **Homo sapiens**

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Max target size 4000

Allow splice variants ☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers ☐ Show results in a new window ☒ Use new graphic view

5. Hacer *click* en el cuadrado de la opción “*Show results in a new window*” y seguido hacer *click* en la opción “*Get Primers*”.

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Specificity check ☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode Automatic

Database nr

Exclusion ☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) ☐ Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Max target size 4000

Allow splice variants ☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

Get Primers ☒ Show results in a new window ☐ Use new graphic view

6. En una nueva ventana, aparecerá el resultado de la búsqueda de especificidad y parámetros de los cebadores como % GC, temperatura de melting (T_m), entre otros.
7. Desplazar el cursor hacia abajo y verificar a qué secuencias los cebadores hacen *match*. Lo ideal, es que todas las secuencias pertenezcan al *target* deseado. En caso los cebadores hagan *match* con otro organismo, verificar si éste se encontrase con facilidad en la muestra a utilizar, de manera que altere los resultados del ensayo

experimental. Si esto sucede, considerar cambiar los cebadores al considerarse no específicos.

Detailed primer reports

Primer pair 1		Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	Sequence (5'→3') GATGAACCTTGTGGGTAGGGCTAGA	24	61.66	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	TGGGTTTTGTCTCCATC	18	53.99	50.00	3.00	0.00

Products on target templates

>MG877556.1 Dengue virus 1 isolate Thai2013, complete genome

product length = 293
 Forward primer 1 GATGAACCTTGTGGGTAGGGCTAGA 24
 Template 9764 9787
 Reverse primer 1 TGGGTTTTGTCTCCATC 18
 Template 10056 10039

>MG877555.1 Dengue virus 1 isolate Ncal2013, complete genome

product length = 293
 Forward primer 1 GATGAACCTTGTGGGTAGGGCTAGA 24
 Template 9765 9788
 Reverse primer 1 TGGGTTTTGTCTCCATC 18
 Template 10057 10040

- Haciendo *click* en el código de cada secuencia encontrada en *Primer-BLAST*, se puede obtener información sobre la proveniencia de la cepa, el año en que se secuenció, y la secuencia en sí del genoma parcial o total.

Dengue virus 1 isolate 48555, complete genome

GenBank: MF033260.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

Go to: ☐

LOCUS MF033260 10735 bp RNA linear VRL 17-AUG-2018

DEFINITION Dengue virus 1 isolate 48555, complete genome.

ACCESSION MF033260

VERSION MF033260.1

KEYWORDS .

SOURCE Dengue virus 1

ORGANISM [Dengue virus 1](#)

Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Flaviviridae; Flavivirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 10735)

AUTHORS Koo,C., Tian,W.P., Xu,H., Ong,J., Rajarethinam,J., Lai,Y.L., Ng,L.C. and Hapuarachchige,C.H.

TITLE Highly Selective Transmission Success of Dengue Virus Type 1 Lineages in a Dynamic Virus Population: An Evolutionary and Fitness Perspective

JOURNAL iScience 6, 38-51 (2018)

REFERENCE 2 (bases 1 to 10735)

AUTHORS Koo,C., Kek,R., Xu,H., Tian,W.P., Ong,J., Tan,S.H., Rajarethinam,J., Lai,Y.L., Hapuarachchige,C.H. and Ng,L.C.

Anexo 5: Síntesis de ADNc: Transcripción reversa usando el protocolo *First-Strand Synthesis Using Random Primers*.

Kit: *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR*

Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11904018>

PROCEDIMIENTO:

1. Mezclar y centrifugar brevemente todos los componentes antes de su uso.
2. Para cada reacción, combinar los siguientes componentes en un tubo de 0.2 mL estéril:

Componente	Cantidad	Cantidad empleada en este ensayo
ARN	n µL	5 µL
10mM dNTP mix	1 µL	1 µL
Random hexameres (50ng/µL)	1-5 µL	4 µL
DEPC-treated water	A 10 µL	-

3. Incubar la mezcla de *primer*/ARN a 65°C por 5 minutos, luego colocar en hielo por al menos 1 minuto.
4. En un tubo separado, preparar la siguiente reacción 2X, agregando cada componente según lo indicado:

Componente	1Rx	4Rx
10X RT buffer	2 µL	8 µL
25 mM MgCl ₂	4 µL	16 µL
0.1 M DTT	2 µL	8 µL
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1 µL	4 µL

5. Agregar 9 µL de la reacción 2X a cada tubo de la mezcla *primer*/ARN del paso 3, mezclar suavemente y centrifugar brevemente.
6. Incubar a temperatura ambiente (25°C) por dos minutos.
7. Agregar 1 µL de *SuperScript™ II RT* a cada tubo. Al control negativo debe agregarse 1 µL de agua tratada DEPC en lugar de RT.

8. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
9. Incubar a 42°C por 75 minutos.
10. Terminar la reacción a 70°C por 15 minutos. Luego dejar reposar en hielo.
11. Centrifugar brevemente y agregar 1 µL de *RNaseH* a cada tubo e incubar por 20 minutos a 37°C.
12. La reacción puede ser almacenada a -20°C o puede ser usada para PCR inmediato.

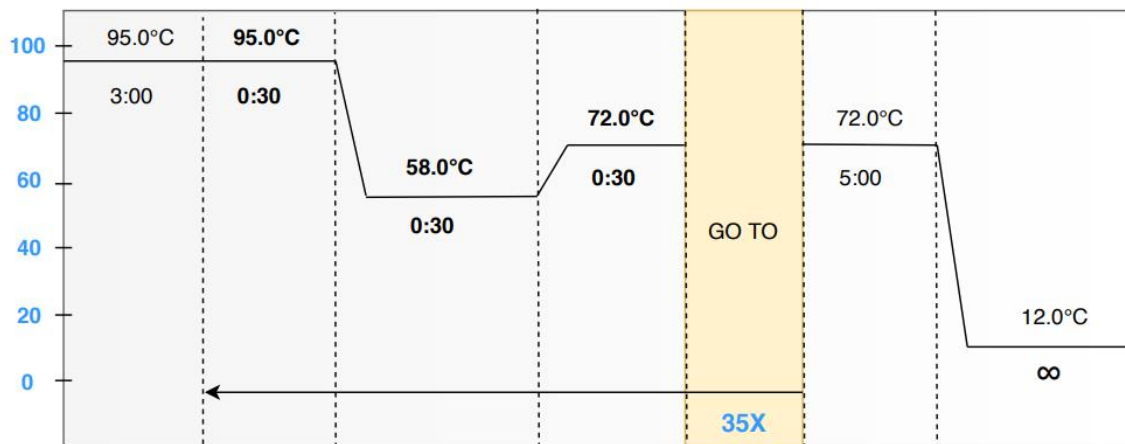
Anexo 6: Amplificación de la secuencia de inserción para el proceso de clonación.

Fueron empleados los cebadores externos F3 Y B3 seleccionados para cada serotipo del virus dengue.

Mix de reacción:

Reactivos	Concentración final	1Rx (μL)
Agua de PCR	-	32.9
PCR Buffer II (10X)	1X	5
MgSO ₄ (50mM)	1.5 mM	1.5
dNTP (25mM C/U)	0.2mM C/U	0.4
Enzima <i>AccuStart II Taq DNA polymerase</i> (5units/μL)	1U/Rx	0.2
Primer forward (10 μM)	0.5 μM	2.5
Primer Reverse (10 μM)	0.5 μM	2.5
DNA	-	5
Volumen Final	-	50

El mix fue dispensado en tubos de 0.2 mL para llevar a cabo el siguiente protocolo de amplificación de PCR convencional:



Finalizado el protocolo de amplificación, se realizó la precipitación del producto de PCR generado.

Anexo 7: Precipitación de los productos de amplificación (inserto) empleando acetato de sodio y etanol.

1. Transferir el producto de PCR a un tubo *eppendorf* de 1.5 mL.
2. Agregar un volumen 1/5 de acetato de sodio 3M, pH 5.2.
3. Agregar 2 volúmenes y medio de etanol al 100% y vortexear.
4. Incubar a -20°C por 1 hora y media como mínimo.
5. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos (20 minutos a 13000 rpm)
6. Descartar el sobrenadante y dejar secar brevemente sobre el papel toalla.
7. Agregar 300 µL de etanol al 70% y vortexear.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos
9. Descartar el sobrenadante y dejar secar por 15 minutos en papel toalla.
10. Colocar 15 min sobre la incubadora de bloque para tubos a 60°C para eliminar los restos de etanol
11. Agregar 15 µL de agua de PCR y dejar Resuspender por 15 minutos. vortexear y hacer *spin*.
12. Realizar un gel de agarosa al 2%.
13. Cargar 5 µL de muestra (5 µL de producto precipitado + 2 µL de *loading dye* en cada pocillo del gel) y 5 µL de marcador molecular (*Ladder* 100pb).
14. Correr el gel de agarosa a 70V por un tiempo de 50 minutos y revelar empleando el fotodocumentador. Observar la presencia de las bandas correspondientes al tamaño de cada producto respectivamente.

Preparación de gel de agarosa al 2%

1. Pesar 0.6 gr de agarosa en papel aluminio y colocar en un frasco.
2. Agregar 30 mL de buffer TBE 0.5X y homogenizar.
3. Calentar en microondas evitando que hierva, hasta que se disuelva completamente la agarosa (medio totalmente transparente).
4. Dejar temperar el medio hasta los 50°C aproximadamente (evitar que gelifique).
5. Cuando el medio haya llegado a los 50°C, agregar 3 µL de bromuro de etidio y homogenizar.
6. Verter la agarosa en el molde y colocar el peine. Esperar hasta que el gel esté compacto.
7. Preparar 10 µL de marcador molecular de 100 pb. Agregar en un tubo de 1.5 mL: 8 µL de agua de PCR, 1 µL de *loading dye* y 1 µL de buffer 100 pb; homogenizar.

Anexo 8: Ligación por inserción en el vector pCR®2.1

Kit: *TA Cloning™ Kit, with pCR™2.1 Vector and One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli*

Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/ta_man.pdf

Se recomienda el uso de productos de PCR frescos (menos de un día de almacenamiento), debido a que las 3'A libres en los productos de PCR pueden degradarse con el tiempo reduciendo la eficacia de la ligadura.

En general, 0.5-1.0 µL de un producto de PCR típico con un inserto de longitud promedio (400-700 pb) dará una proporción adecuada de 1:1 (vector: inserto) y por tanto una ligadura eficiente.

No usar más de 3 µL de muestra de PCR en la reacción de ligación debido a que las sales de la muestra pueden inhibir la ADN ligasa *T4*.

PROCEDIMIENTO

1. Centrifugar un vial de pCR®2.1 para coleccionar todo el líquido en el fondo del vial.
2. Preparar la reacción de ligación de la siguiente manera:

Componente	Cantidad	Cantidad empleada en este ensayo
Agua de PCR	A un volumen de 10 µL	2 µL
5X <i>T4</i> DNA Ligase Reaction Buffer	2 µL	2 µL
pCR®2.1 vector (25 ng/µL)	2 µL	2 µL
enzima ADN Ligasa ExpressLink™ <i>T4</i>	1 µL	1 µL
Producto de PCR fresco	x µL	3 µL
Volumen Final	10 µL	10µL

3. Incubar la reacción de ligación a temperatura ambiente por 1 hora y media.

Anexo 9: Transformación de bacterias *E.coli* químicamente competentes.

Kit: *TA Cloning™ Kit, with pCR™2.1 Vector and One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli*

Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/ta_man.pdf

PROTOCOLO MODIFICADO:

1. Colocar el baño maria a 42°C.
2. Colocar el medio S.O.C y las placas con agar LB más ampicilina (100µg/µL concentración final) a 37°C.
3. Centrifugar los viales conteniendo los constructos (reacción de ligación) y colocarlos en hielo.
4. Descongelar, en hielo, un vial de 100 µL de células competentes One Shot® para cada transformación.
5. Pipetear 5 µL de cada reacción de ligación directamente dentro del vial con células competentes y homogenizar suavemente con la pipeta.
6. Incubar lo viales en hielo por 30 minutos. Almacenar el mix de ligación restante a -20°C.
7. Hacer *heat shock* a las células por 2 minutos a 42°C sin agitar. Inmediatamente transferir los viales al hielo.
8. Agregar 250 µL de medio S.O.C (a 37°C) a cada vial.
9. Incubar los viales a 37°C por una hora a 225 rpm en el *shaker*.

Siembra:

1. En placas de agar LB más ampicilina, agregar 80 µL de X-gal, 5 µL de IPTG directo a la placa y 100 µL de las células transformadas anteriormente.
2. Rastrillar suavemente empleando un asa de digralsky hasta que seque lo agregado en la placa de agar LB.
3. Incubar las placas por 20 horas a 37°C. Observar al día siguiente crecimiento de colonias blancas (80% placa) y colonias azules.

Preparación de agar LB (luria bertani)

Para preparar 1L de agar LB

1. Agregar 25 gr de medio LB más 15 gr de agar y aforar a 1L con agua desionizada.
2. Autoclavar 20 minutos a 15 lbs/seg. pH del medio 7.0.
3. Dejar temperar a 50°C y agregar ampicilina (1 µL de ampicilina/mL de agar LB).
4. Homogenizar, distribuir en placas y dejar enfriar.

NOTA: En caso de preparar caldo LB, realizar el mismo procedimiento sin agregar agar y distribuir 3mL de caldo por cada tubo estéril.

Preparación de X-gal al 2% (5ml W/V)

1. Colocar 0.1 gr de X-gal en un tubo falcon de 15 mL.
2. Se resuspendió en 5 mL de DMSO. (Envolver el falcon en papel aluminio para protegerlo de la luz).
3. Filtrar (filtro de 0.22µm) en cabina estéril y finalmente alicuotar 1ml en tubos *eppendorf* de 1.5 mL. Cubrir cada tubo con papel aluminio y almacenar a -20°C.

Preparación de IPTG al 20% (5ml W/V)

1. Colocar 1 gr de IPTG en un falcon de 15 mL.
2. Se resuspendió en 5 mL de agua de PCR.
3. Filtrar (filtro de 0.22µm) en cabina estéril y finalmente alicuotar 1ml en tubos *eppendorf* de 1.5 mL.
4. Almacenar a -20°C.

Anexo 10: Purificación del ADN plasmídico

PROCEDIMIENTO:

1. Centrifugar los tubos estériles con el cultivo bacteriano por 10 minutos a 3000`g. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender las células peleteadas en 100 µL de solución alcalina I (Tris 25mM, EDTA 10mM, glucosa 50mM a pH 8.0). Colocar en hielo.
3. Agregar 200 µL de solución alcalina II y combinar por inversión. Colocar en hielo por 5 minutos.
4. Agregar 150 µL de solución III (Acetato de sodio 3M a pH 5.2), combinar por inversión e incubar en hielo por 5 minutos. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C.
5. Trasvasar el sobrenadante en un nuevo tubo *ependorf* de 1.5 ml y agregar 2 volúmenes de etanol absoluto. Incubar por 30 minutos a -20°C. Centrifugar a máxima velocidad y retirar el sobrenadante.
6. Secar en papel toalla y agregar 1ml de etanol al 70% e incubar por 5 minutos.
7. Centrifugar a máxima velocidad, retirar el sobrenadante por inversión y secar en papel toalla. Colocar los tubos abiertos en el baño maria a 50°C hasta que todo el etanol se evapore.
8. Agregar 50 µL de buffer elution. Realizar el gel de agarosa.

Anexo 11: Aprobación por el comité de ética de la UPCH.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología (DUICT)

CONSTANCIA 027 - 03 - 17

El Miembro del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética, bajo la categoría de revisión **EXPEDITA**. La aprobación será ratificada en la sesión del comité más próxima a la fecha de emisión de este documento.

Título del Proyecto : "Elaboración de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial para zika, dengue, chikungunya y malaria".

Código de inscripción : 100405

Investigador principal : Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. Protocolo de investigación, versión recibida el 11 de enero del 2017.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **19 de enero del 2018**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 20 de enero del 2017.

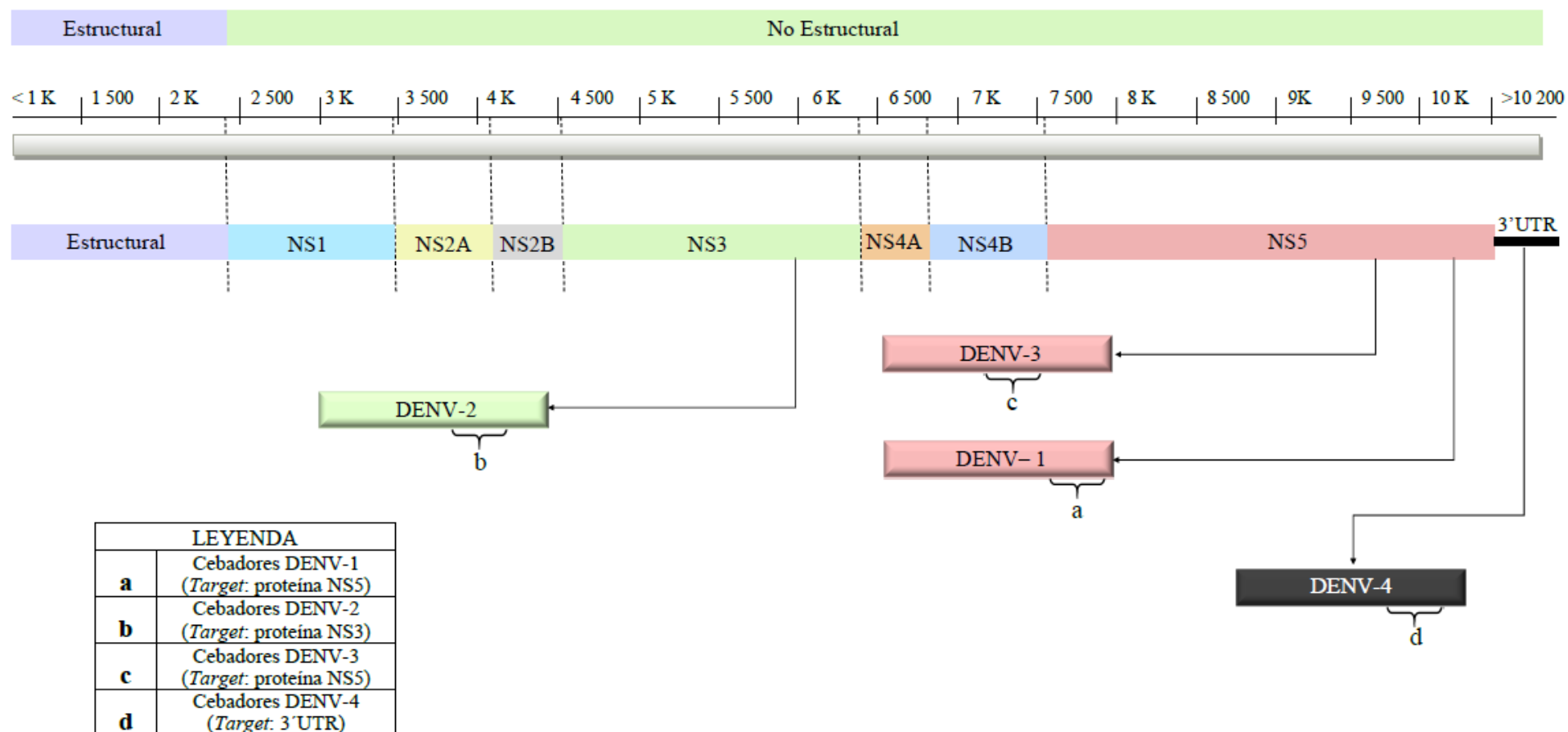
Dra. Inés Bustamante Chávez
Presidenta (i)

Comité Institucional de Ética en Investigación




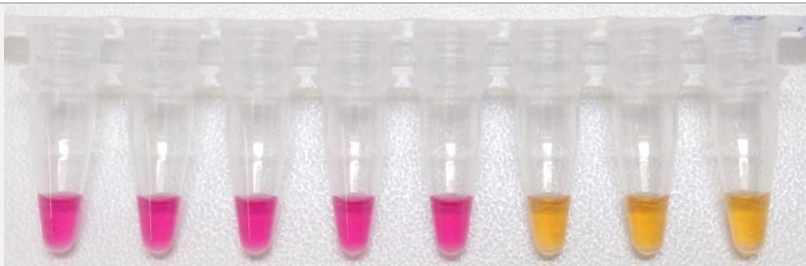
/s/

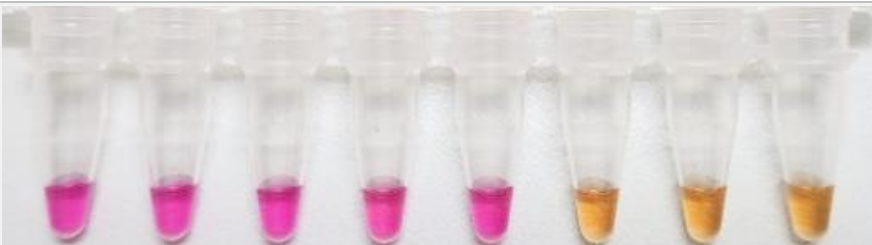
Anexo 12: Mapa de ubicación de los *targets* para los cebadores LAMP *in-house* dentro de la poliproteína del virus dengue.

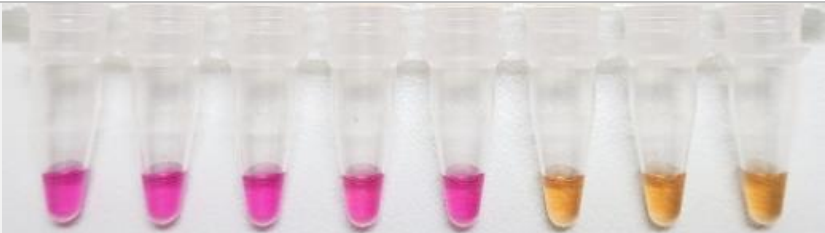


Anexo 13: Ensayo de determinación del LoD₆ para cebadores LAMP de diferenciación del virus dengue.

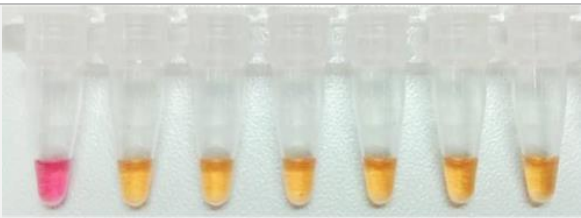

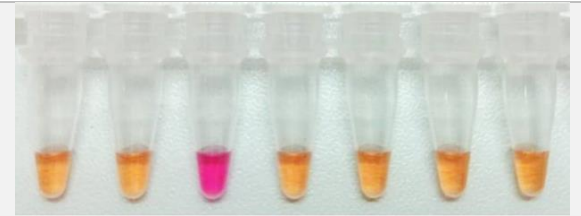
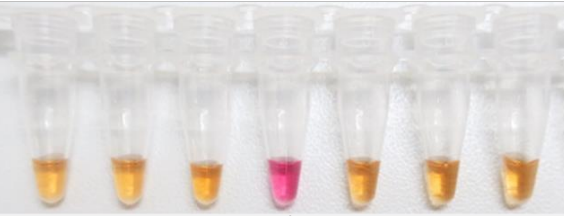
LoD ₆ Cebadores DENV-1								
								
1	2	3	4	5	6	7	8	
11,239,280 Cop/μL	1,123,928 Cop/μL	112,393 Cop/μL	11,239 Cop/μL	1,124 Cop/μL	112 Cop/μL	11 Cop/μL	Bx	

LoD ₆ Cebadores DENV-2								
								
1	2	3	4	5	6	7	8	
26,206,445 Cop/μL	2,620,645 Cop/μL	262,065 Cop/μL	26,207 Cop/μL	2,621 Cop/μL	262 Cop/μL	26 Cop/μL	Bx	

LoD ₆ Cebadores DENV-3								
								
1	2	3	4	5	6	7	8	
186,488,500 Cop/μL	18,648,850 Cop/μL	1,864,885 Cop/μL	186,489 Cop/μL	18,649 Cop/μL	1,865 Cop/μL	187 Cop/μL	Bx	

LoD ₆ Cebadores DENV-4								
								
	1	2	3	4	5	6	7	8
	2,283,643 Cop/μL	228,364 Cop/μL	22,836 Cop/μL	2,284 Cop/μL	228 Cop/μL	23 Cop/μL	2.3 Cop/μL	Bx

Anexo 14: Ensayo de especificidad analítica de los cebadores de diferenciación del virus dengue

<i>Primers DENV-1</i>	<i>Primers DENV-2</i>
	
DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4 Zika Chik. Bx	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4 Zika Chik. Bx
<i>Primers DENV-3</i>	<i>Primers DENV-4</i>
	
DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4 Zika Chik. Bx	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4 Zika Chik. Bx

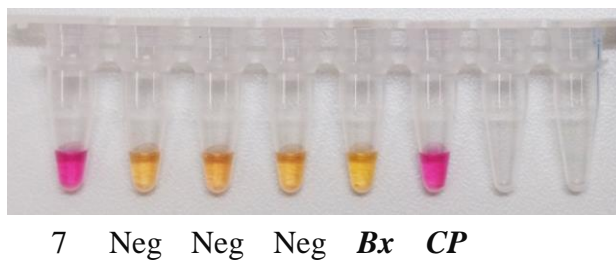
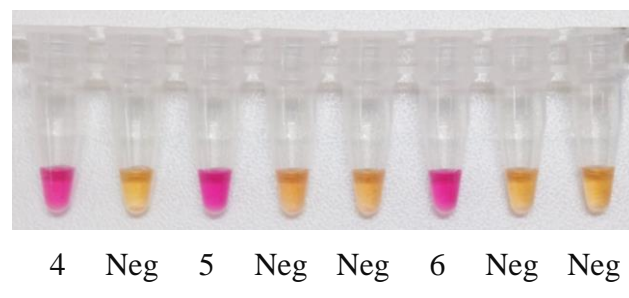
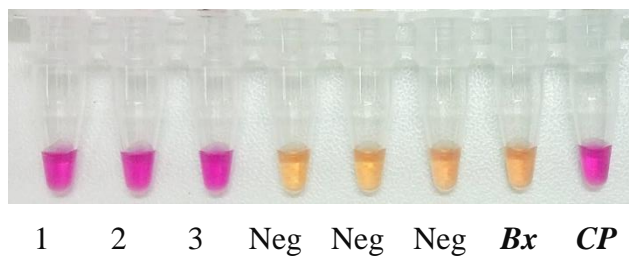
Los cebadores LAMP de diferenciación fueron específicos solo a su *target*. Por tanto los cuatro sets de cebadores de diferenciación del virus dengue mostraron una especificidad analítica del 100%.

Anexo 15: Evaluación de muestras por PCR en tiempo real y LAMP de diferenciación.

PCR en tiempo real DENV-2:

Nº	ID muestra	Cq	Tm
1	005	26.64	82.0
2	009	24.63	82.0
3	020	38.61	82.0
4	501108	17.94	82.5
5	502288	18.51	82.5
6	503286	20.71	82.5
7	503289	18.08	82.5
8	CP	20.11	82.0

LAMP con cebadores para DENV-2:



* CP= Control positivo.
 Bx= Blanco de reacción.
 Tm= Temperatura de melting.
 Cq= Ciclo de amplificación del PCR en tiempo real.